



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS  
MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**USO TERAPÊUTICO DOS HELMINTAS**

Trabalho submetido por

**Pedro Bernardo Sales Barreto das Neves Coelho**

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**março de 2017**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS  
MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**USO TERAPÊUTICO DOS HELMINTAS**

Trabalho submetido por

**Pedro Bernardo Sales Barreto das Neves Coelho**

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

**Prof. Doutora Guilhermina Martins Moutinho**

**março de 2017**

“Tudo o que é de grande importância tem de ter um início, mas o caminho até chegar à sua conclusão, até estar completamente finalizado, é que detém a verdadeira glória.”

**Sir Francis Drake**

## **Agradecimentos**

Agradeço a toda a minha família, aos meus Avós, aos meus Tios e Primos por me terem apoiado incondicionalmente durante esta etapa importante da minha vida, sem vocês não teria sido possível.

Obrigado Pai e Mãe, vocês que em troca de nada, me deram tudo. Obrigado Nuno pelo apoio nas horas difíceis, pelos conselhos e pela motivação. Obrigado à Prazeres por me ter criado, por todo o carinho e afecto e por ser a minha 2ª Mãe.

Obrigado à Inês por todo o amor, afecto, carinho e por me ter incutido motivação e determinação para concluir esta monografia.

Obrigado à minha Orientadora, Prof. Doutora Maria Guilhermina Moutinho, pela sua paciência, apoio, aconselhamento e ajuda na realização desta monografia.

Obrigado ao meu primeiro Orientador, Prof. Doutor Jorge Fonseca, pela escolha de um tema tão interessante, apesar de não me ter conseguido acompanhar na redacção por motivos de saúde (encontrando-se, felizmente, já curado).

Obrigado às minhas amigas Ana Cláudia Coelho, Ana Filipa Carvalho, Cristiana Almeida e Tatiana Mendes, pela amizade, pela paciência, pelos momentos divertidos e inesquecíveis e pela ajuda nos momentos menos bons.

Obrigado a todos os meus amigos e colegas de turma, especialmente ao António Tanganho, Filipe Correia, Mickael Santos, Gonçalo Cravo e Miguel Sousa, por serem como verdadeiros irmãos e por me darem grandes recordações destes anos inesquecíveis.

Obrigado aos meus amigos de sempre Aly Gina, André Santos e João Jesus, por esta amizade que já dura há 10 anos, por todo o apoio e por todos os momentos fenomenais que passei (e continuarei a passar) com eles.

Obrigado à Casa Do Finalista, nomeadamente ao Diogo Dias, Ivan Real, João Mestre, João Moedas e João Silva por todos os momentos fantásticos e inolvidáveis que passámos juntos.

Obrigado à AE-ISCSEM, por ter sido a minha segunda casa nestes 5 anos de faculdade, por todos os momentos passados e ensinamentos transmitidos e por todos aqueles que lá conheci e que irão perdurar na minha memória.

Obrigado a todos os Professores que contribuíram para a minha formação ao longo de toda a minha vida de estudante.

E, por fim, um enorme obrigado à Academia Egas Moniz, será para sempre a minha Casa, da qual me custará separar e onde vivi os melhores e mais enriquecedores anos da minha vida.

Obrigado a Todos.



## Resumo

Ao longo dos últimos 70 anos tem havido um aumento exponencial na incidência de doenças do foro auto-imune, alérgico e inflamatório. Com o aumento do número de doentes afectados por patologias como Diabetes *Mellitus*, Esclerose Múltipla, Doença Reumática, Doença Alérgica, Asma, entre outras, surgiu a necessidade de entender os mecanismos fisiopatológicos das mesmas, bem como as suas causas etiológicas e possíveis tratamentos e/ou estratégias de prevenção.

Este aumento apenas se tem verificado nos países ocidentais industrializados, devido à melhoria das condições de vida, com mudanças a nível alimentar, higiénico, ambiental ou medicamentoso, enquanto que nos países não desenvolvidos estas doenças continuam a ter uma prevalência reduzida. Por outro lado, estes países continuam a ter uma incidência bastante elevada de parasitoses, sendo as helmintoses um dos tipos mais comuns.

Vários estudos epidemiológicos apuraram que existe uma proporcionalidade inversa entre a prevalência de infecções helmínticas e a incidência das doenças supramencionadas, o que está de acordo com a “Hipótese de Higiene”. Esta teoria atribui o incremento das referidas patologias em países desenvolvidos à falta de “convivência” entre o Sistema Imunitário humano com determinados parasitas, impedindo-o assim de estabelecer os mecanismos imunológicos na sua plenitude.

Devido ao facto dos Helminthas colonizarem o organismo humano há milénios, estes adaptaram-se com vista a maximizar o tempo de permanência dentro do hospedeiro, desenvolvendo complexas “estratégias” de imunomodulação que lhes permite atenuar respostas inflamatórias excessivas no hospedeiro que possam causar danos a ambos.

Esta monografia constitui uma revisão bibliográfica sobre os conhecimentos obtidos relativamente a esta matéria, na tentativa de potenciar um uso terapêutico dos Helminthas. Após análise dos mecanismos de imunomodulação e de apurar quais os resultados experimentais positivos obtidos tanto em animais como em humanos, esta revisão conclui que a investigação sobre um uso terapêutico dos Helminthas está ainda no início e que existem vários entraves a ultrapassar para conseguir aplicar todo o potencial existente desta terapia na prática clínica.

**Palavras-Chave:** Helminthas, Terapêutica Helmíntica, IL-10, TGF- $\beta$ , Bregs, Tregs

## ***Abstract***

For the past seventy years, there has been an exponential growth in the incidence of autoimmune, allergic, and inflammatory diseases. With the increase of patients affected by pathologies such as Diabetes *Mellitus*, Multiple Sclerosis, Rheumatic Disease, Allergic Disease, Asthma, among others, it has emerged a need to understand their pathophysiological mechanisms, as well as their underlying causes and possible treatments and/or prevention strategies.

This increase has only been verified in the industrialized western countries, due to the improvement of living conditions, with dietary, hygienic, environmental and medication changes, whereas in developing countries these diseases continue to have a low prevalence. On the other hand, these countries continue to have a high incidence of parasitic infections, being helminthiasis one of the most common.

Several epidemiological studies have discovered there is an inverse proportionality between the prevalence of helminth infections and the incidence of the above-mentioned diseases, accordingly with the “Hygiene Hypothesis”. This theory imputes the increase of pathologies in developed countries to the lack of coexistence between the human Immune System and certain parasites, therefore preventing it from establishing the immunological mechanisms to their fullness.

Since Helminths have colonized the human organism for millennia, they have adapted to maximize residence time within the host by developing complex immunomodulation "strategies" that allow them to attenuate excessive inflammatory responses in the host that can cause damage to both.

This monograph represents a bibliographical review of the knowledge obtained in this matter, in the attempt of promoting a therapeutic use of Helminths. After reviewing the immunomodulation mechanisms and ascertaining the positive experimental results obtained in both animals and humans, this review concludes that the research on a therapeutic use of Helminths is still in its infancy and there are several hurdles to overcome, in order to successfully apply all the existing potential of this therapy in the clinical practice.

**Keywords:** Helminths, Helminth Therapy, IL-10, TGF- $\beta$ , Bregs, Tregs



## Índice Geral

Resumo .....	1
Abstract .....	2
Índice Geral.....	3
Índice de Figuras .....	4
Índice de Tabelas .....	5
Lista de abreviaturas.....	6
Introdução .....	8
1. Helminhas .....	10
1.1 Classificação Taxonómica de Helminhas.....	11
1.2 Epidemiologia.....	13
1.3 Fisiopatologia das Helminthoses.....	14
2. Helminhas e o Sistema Imunitário .....	17
3. Terapêutica helmíntica versus Terapêutica Farmacológica .....	28
4. Uso Terapêutico dos Helminhas .....	32
4.1 Terapêutica helmíntica na Diabetes.....	33
4.2 Terapêutica helmíntica em Doenças Reumáticas .....	41
4.3 Terapêutica helmíntica na Esclerose Múltipla.....	46
4.4 Terapêutica helmíntica na Doença Alérgica .....	51
4.4.1 Asma .....	55
4.5 Terapêutica helmíntica nas Doenças Inflamatórias Intestinais.....	61
4.6 Efeitos adversos.....	66
Conclusões .....	68
Bibliografia.....	70

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Processos imunomoduladores mediados por Helmintas. Ilustração das vertentes onde os parasitas actuam (Weinstock, 2012) .....	19
<b>Figura 2</b> - Resposta imunitária desencadeada por moléculas imunomodulatórias produzidas por Helmintas (Finlay CM, Walsh KP, & Mills KH, 2014) .....	21
<b>Figura 3</b> - Efeitos dos antígenos E/S nas células do SI (Harnett, 2014).....	25
<b>Figura 4</b> - Formas de potenciar a investigação sobre o Uso Terapêutico dos Helmintas - adaptado de (Tilp, Kapur, Loging, & Erb, 2013) .....	32
<b>Figura 5</b> - Intervenção terapêutica dos Helmintas e seus produtos na prevenção do desenvolvimento da DM1 (Achim et al., 2015) .....	34
<b>Figura 6</b> - Intervenção terapêutica dos Helmintas e seus produtos na prevenção do desenvolvimento da DM2 (Achim et al., 2015) .....	36
<b>Figura 7</b> - Efeito dos Bregs induzidos pelos Helmintas na prevenção da Asma alérgica (Hussaarts, Van Der Vlugt, Yazdanbakhsh, & Smits, 2011) .....	57
<b>Figura 8</b> - Protecção conferida pelos Helmintas nas DII (Giacomin, Agha, & Loukas, 2016).....	63

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Características e Diferenças entre as várias Classes de Helmintas (adaptado de Chiodini et al., 2003) .....	12
<b>Tabela 2</b> - Espécies de Helmintas mais susceptíveis de causar doença (adaptado de Chiodini et al, 2003) .....	12

## Lista de abreviaturas

DM1 – Diabetes *Mellitus* tipo 1  
DII - Doença Inflamatória Intestinal  
SI- Sistema Imunitário  
STH – *Soil Transmitted Helminths*  
EM – Esclerose Múltipla  
LES – Lúpus Eritematoso Sistémico  
IL – Interleucina  
TGF- $\beta$  – Factor de Transformação do Crescimento  $\beta$   
Linfócitos Th – Linfócitos T *helper*  
Linfócitos Tregs – Linfócitos T reguladores  
E/S – Excretores/ Secretores  
CAA – Células Apresentadoras de Antígenos  
M2 – Macrófagos tipo 2  
MAA – Macrófagos Alternadamente Activados  
CLI – Células Linfóides Inatas  
CD – Células Dendríticas  
Linfócitos Bregs – Linfócitos B reguladores  
MI – Moléculas Imunomodulatórias  
PTQ – Proteínas Tipo Quitinase  
TSLP – *Thymic Stromal Lymphopoietin*  
IG – Imunoglobulina  
MBP – *Major Basic Protein*  
IFN- $\gamma$  – Interferão- $\gamma$   
CTLA-4 - *Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4*  
PD-1 - *Programmed Cell Death Protein 1*  
Foxp3 - *Forkhead Box p3*  
LNFPIII - Lacto – N – Fucopentose III  
MIF – *Migration Inhibitory Factor*  
Linfócitos Tc – Linfócitos T citotóxicos  
NKT – *Natural Killer T*  
TLR – *Toll-Like Receptor*  
LPS – Lipossacárido

AR – Artrite Reumatóide  
DM2 – Diabetes *Mellitus* tipo 2  
HbA1c – Hemoglobina Glicosilada  
STZ – Streptozotocina  
AIC – Artrite Induzida por Colagénio  
SNC – Sistema Nervoso Central  
EMSR – Esclerose Múltipla Surto Remissão  
EMSP – Esclerose Múltipla Secundária Progressiva  
EMPP – Esclerose Múltipla Primária Progressiva  
EAE – Encefalomielite Auto-Imune Experimental  
CSP – Células Sanguíneas Periféricas  
Der p1 – antígeno de *Dermatophagoides pteronyssinus*  
CU – Colite Ulcerosa  
DC – Doença de Crohn  
CI – Colite Induzida

## Introdução

A análise estatística dos dados de saúde pública de países por todo o mundo revelou vários contrastes resolutos, de entre os quais uma impressionante reciprocidade entre as infecções helmínticas em países tropicais com baixo rendimento e as condições clínicas tidas como “modernas” tais como a alergia e auto-imunidade. Estas últimas estão a tornar-se bastante prevalentes em países desenvolvidos, com a Asma a afectar cerca de 10% das crianças em vários países europeus enquanto que a incidência de doenças auto-imunes como a Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) e a Doença Inflamatória Intestinal (DII) continua a progredir (R. M. Maizels, 2016).

Ao mesmo tempo que o estilo de vida e as condições sanitárias sofreram uma melhoria, esta veio acompanhada por um decréscimo na quantidade de infecções parasitárias que diminui a exposição a Helmintas e outros micróbios durante a infância, o que pode, eventualmente, ter potenciado o desenvolvimento de um Sistema imunitário “desequilibrado”, sem capacidade para controlar os seus próprios mecanismos de acção (Bashi, Bizzaro, Ben-Ami Shor, Blank, & Shoenfeld, 2014).

Esta teoria foi postulada por Strachan em 1989 e denominada pelo mesmo de “Hipótese de Higiene”, sendo que a mesma defende a ideia de que alguns agentes infecciosos – em particular, aqueles que co-evoluíram com o ser humano – têm a habilidade de proteger o nosso organismo de uma vasta gama de doenças relacionadas com os processos imunológicos (Okada, Kuhn, Feillet, & Bach, 2010).

As patologias alérgicas e auto-imunes têm, como causa etiológica, uma resposta imunitária exagerada direccionada a antigénios inócuos como os presentes no meio ambiente ou endogenamente. Assim, tem-se questionado se os Helmintas têm a capacidade de “amortecer” o Sistema Imunitário do hospedeiro para promover a sua própria sobrevivência e se, ao longo deste processo, contribuem também para a prevenção de respostas exageradas não direccionadas aos mesmos, como por exemplo auto antigénios e alergénios (Rick M. Maizels & McSorley, 2016).

A habilidade que os Helmintas e outros agentes infecciosos possuem em inibir respostas inflamatórias levou à exploração da eficácia clínica da utilização de infecções controladas na patogénese de várias doenças assim como à pesquisa de moléculas bem caracterizadas obtidas a partir de microrganismos, analisando assim o potencial para actuarem como bio moduladores disponíveis para utilização terapêutica no tratamento de doenças caracterizadas por um elevado perfil inflamatório (Zacone & Cooke, 2013).

Assim, o objectivo deste trabalho consiste no esclarecimento dos conhecimentos obtidos até à data através de inúmeras experiências e estudos científicos, cujos autores procuraram contribuir para o entendimento dos potenciais efeitos benéficos das infecções helmínticas ou das moléculas que podem ser obtidas através destes parasitas. De forma a enquadrar o tema, far-se-á primeiramente uma breve revisão e descrição das características dos Helmintas. De seguida, irá descrever-se os mecanismos através dos quais os mesmos interagem com o Sistema Imunitário (SI) humano, sendo que, na última parte da monografia, irá ser abordada a maneira como estes parasitas podem intervir na patogénese de inúmeras doenças com vista ao seu tratamento e/ou prevenção, fazendo referência aos resultados positivos de vários estudos, desde experiências com recurso a roedores a ensaios clínicos.

É de ressaltar que, para efeitos de delimitação de tema, apenas serão abordadas as patologias onde existe mais evidência de que os Helmintas podem ser usados terapêuticamente, apesar de existirem vários estudos que extrapolam uma possível utilização destes parasitas em doenças que não são debatidas nesta monografia. Adicionalmente, queria ainda referir que certas partes do início do desenvolvimento são suportadas por material bibliográfico antigo, isto devido ao facto de a biologia, taxonomia e epidemiologia dos Helmintas já terem sido descritas há relativamente bastante tempo.

Nota do autor: a presente monografia foi elaborada sem ter em conta o Novo Acordo Ortográfico.

## **1. Helmintas**

Helmintas são seres multicelulares parasitários que colonizam tanto o intestino delgado como o colón humano, podendo ainda ser encontrados no tracto urinário, nos pulmões, no cérebro e no sangue (Brown, 2011) . As estimativas apontam para que cerca de um terço da população mundial (2 mil milhões de pessoas) esteja infectada, sendo particularmente comuns nos países em desenvolvimento (Rick M. Maizels & McSorley, 2016).

Apesar de muitas vezes estes parasitas não contribuírem para graves complicações, podendo a sua colonização ser assintomática, estas contribuem para o aumento da morbilidade em indivíduos fortemente infectados. Segundo alguns investigadores, mesmo infecções moderadas, podem gerar efeitos nefastos no crescimento, desenvolvimento cognitivo e no desenvolvimento fetal (Brown, 2011). Apesar disto, as recentes alterações nas condições socioeconómicas dos países desenvolvidos, bem como a implementação de controlo sanitário e de regras de higiene, têm vindo a contribuir para alterar o panorama global das infecções helmínticas transmitidas através do solo (De Silva et al., 2003).

Contudo, durante muitos séculos, o quadro das infecções helmínticas, designadas de helmintíases ou helmintoses, foi bastante diferente. As infecções por parasitas intestinais têm estado presentes no ser humano desde que estes apareceram há duzentos mil anos atrás, podendo oferecer várias vantagens ao hospedeiro, não obstante as patologias que podem também causar, à semelhança do que se verifica com bactérias entéricas comensais. Com o aparecimento de fármacos anti-helmínticos, as helmintoses – que antes matavam uma em cada cinco crianças, para além de vários adultos – sofreram um decréscimo acentuado da mortalidade. Para além disso, hoje em dia, a maioria dos produtos alimentares e da água que ingerimos é sujeita a um controlo de qualidade rígido que reduz a probabilidade de estarem contaminados. Estes factores podem, igualmente, ter contribuído para a diminuição da incidência de helmintoses que se observa nos países desenvolvidos ocidentais (Weinstock, 2012).

Apesar de toda a importância económica e educacional que acarretam, e ainda em matéria de saúde pública, as helmintoses são ainda uma patologia negligenciada por



grande parte da comunidade médica e internacional devido a três simples factores (Bethony et al., 2006):

- i. As pessoas mais afectadas são as pessoas mais carenciadas a nível mundial, sendo que muitas delas vivem com menos de 1 euro por dia;
- ii. As helmintoses causam problemas de saúde crónicos e muitas vezes têm um perfil clinico enganador;
- iii. Quantificação dos danos causados pela infecção por STHs a nível económico e educacional é difícil de realizar;

### 1.1 Classificação Taxonómica de Helminthas

Os Helminthas, palavra originária do grego “*hélmintos*” (verme), pertencem ao reino Animalia, ao sub-reino Metazoa, e são seres de tamanho superior relativamente aos protozoários, pois para além de serem seres multicelulares, estes podem, normalmente, ser vistos a olho nu quando atingem a forma adulta havendo, no entanto, várias espécies que são microscópicas. São seres vivos que se reproduzem sexualmente, na sua maioria, dentro do hospedeiro, apesar de haver a possibilidade de certos estados (larvas, ovos) viverem no meio ambiente (Jeffrey & Leach, 1991).

Os Helminthas estão divididos em dois grandes grupos, o Filo dos Platyhelminthes (vermes achatados), que incluem duas classes com interesse em termos de saúde pública, a classe *Cestoda* e a *Trematoda*, e o Filo dos Nematelminthes (vermes cilíndricos), sendo que estes possuem várias diferenças entre si que vão além da sua forma anatómica, principalmente na forma como se alimentam. Os Nematelminthes são mais complexos, pois têm um sistema digestivo completo (boca, intestino, ânus). Apesar de alguns Platyhelminthes poderem ter intestino, nenhuma espécie possui cavidade oral, sendo que estes se alimentam através de uma matriz gelatinosa pela qual absorvem os nutrientes (Jeffrey & Leach, 1991).

As três principais infecções por Platyhelminthes que afectam o ser humano são a Cisticercose, a Schistosomose e a Teniose. As três principais infecções por Nematelminthes, ou STH (*Soil-Transmitted Helminths*), são a Tricuriose, a Ascaridiose e a Ancilostomiose, pertencentes à classe dos *Nematoda* (Bethony et al., 2006). Apesar de serem patologias diferentes causadas por parasitas diferentes, estas são muitas vezes

consideradas em conjunto, pois é bastante comum, especialmente em crianças de países menos desenvolvidos, haver uma infecção crônica múltipla por parte destas espécies de Helmintas, que se pode manifestar através de malnutrição, estagnação do crescimento e ainda déficit cognitivo e educacional a nível mundial (Bethony et al., 2006).

De seguida, são apresentadas as diferenças anatómicas mais relevantes entre as classes de Helmintas com importância médica, como é possível ver na tabela 1 (Chiodini, P. L., Moody, A. H., & Manser, D. W, 2003):

Tabela 1 - Características e Diferenças entre as várias Classes de Helmintas (adaptado de Chiodini et al., 2003)

Nematodes	Cestodes	Trematodes
Não-segmentados	Segmentados	Não-segmentados
Possuem boca, esôfago e ânus	Possuem <i>scolex</i> , pescoço e proglotidos	Forma de folha ou cilíndrica
Diferenciação sexual	Hermafroditas	Geralmente Hermafroditas
Reprodução por larvas ou ovos	Reprodução por ovos ou multiplicação de estados larvares;	Reprodução por ovos ou multiplicação de estados larvares;
Infecção dá-se por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingestão de ovos;</li> <li>• Penetração larvar pela pele;</li> <li>• Vector artrópode;</li> <li>• Ingestão de larvas presentes em quistos;</li> </ul>	Infecção geralmente causada por larvas encapsuladas	Infecção dá-se principalmente pela invasão do TGI por estados larvares, por vezes através da pele

Dentro destas classes, apenas algumas espécies têm importância médica, sendo que estas estão enumeradas na tabela 2:

Tabela 2 - Espécies de Helmintas mais susceptíveis de causar doença (adaptado de Chiodini et al, 2003)

Nematodes	Cestodes	Trematodes
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Taenia solium</i>	<i>Schistosoma spp</i>
<i>Brugia malayi</i>	<i>Taenia saginata</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>Trichuris suis (whipworm)</i>	<i>Hymenolepis nana</i>	<i>Fasciolopsis buski</i>
<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>	<i>Paragonimus westermani</i>
<i>Strongyloides stercoralis (hookworm)</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>

É importante referir que as espécies supramencionadas são apenas as espécies com maior importância médica e que costumam gerar helmintoses com sintomatologia. Ao longo da monografia vão ser abordadas outras espécies com potencial terapêutico, mas com uma prevalência bastante reduzida, pelo que não foram mencionadas na tabela 2, assim como as Filárias, pertencentes ao Filo dos Nematelmintes.

## 1.2 Epidemiologia

A distribuição e presença de Helminthas e das infecções causadas por estes parasitas teve um declínio muito acentuado ao longo dos anos. Com a crescente melhoria do paradigma social e económico das populações ao longo do século XX, em particular após a 2ª guerra mundial, tornou-se necessário obter dados mais criteriosos acerca da infecção das populações por parte destes parasitas intestinais. A primeira estimativa, feita em 1947 por Norman Stoll, viria a ser actualizada em 1994 por Chan *et al*, e ainda mais recentemente por De Silva e colaboradores (2003), estimativas que permitiram tirar ilações interessantes acerca deste assunto.

De Silva e colaboradores descobriram que as três infecções por STH mais comuns estão presentes em grande parte nas zonas dos trópicos e dos sub-trópicos. A Ascaridiose, à data, tinha uma grande prevalência na China e no Sudeste Asiático, nas zonas costeiras no oeste de África e na África Central. A Tricuriose, por sua vez, tinha uma grande prevalência na África Central, no sul da Índia e no Sudeste Asiático, enquanto que as infecções por *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* são bastante comuns na África subsaariana, para além de também afectarem zonas como o Sul da China e o Sudeste Asiático (De Silva et al., 2003).

As estimativas de De Silva *et al.* apontavam para que, mundialmente, existissem mais de 1,2 mil milhões de infecções por *Ascaris lumbricoides*, sendo que cerca de 50% destes casos dizem respeito à China, país que, à data, registava a maior prevalência desta helmintose. Esta é de longe a infecção helmíntica com mais expressão, sendo que a tricuriose e a ancilostomiose registavam cerca de 700 a 800 milhões de casos, cada uma. Quanto à ancilostomiose, a China e a África subsaariana são as zonas onde esta tinha maior prevalência, com a presença de cerca de 200 milhões de casos, em cada uma das áreas (Brooker, Clements, & Bundy, 2006).

De Silva *et al.* compararam os dados obtidos em 1994 por Chan *et al.* e analisaram-nos transversalmente com os dados que obtiveram em 2003. Através desta comparação, foi possível perceber que houve uma redução drástica da prevalência de helmintoses no continente americano e asiático, sendo que em muitos países esta diminuição foi provocada pelo desenvolvimento de medidas de controlo por parte dos governos, associadas ao desenvolvimento económico e social (De Silva et al., 2003).

### 1.3 Fisiopatologia das Helmintoses

Como já foi dito, a maior parte da população infectada por Helmintas nem sempre chega a desenvolver a doença associada a estes, sendo muito provável que um indivíduo infectado possa co-existir com estes organismos, sem apresentar manifestações clínicas durante toda a sua vida. Normalmente, as helmintoses com sintomatologia, geralmente estão associadas a situações onde a predisposição económica, social e ambiental das populações potencia o aparecimento de estados infecciosos, associados a zonas onde a morbilidade é muito elevada e onde muitos indivíduos são portadores de grandes quantidades de Helmintas (Mulcahy, O'Neill, Donnelly, & Dalton, 2004).

Para além disto, as helmintoses sintomáticas podem ainda desenvolver-se no caso de haver infecção helmíntica por parte de uma espécie cujo hospedeiro ainda não tinha sido exposto, em casos de indivíduos imunodeprimidos ou malnutridos, ou ainda devido a alterações ambientais, sendo que a probabilidade de esta se desenvolver vai reduzindo com o aumento da idade (Mulcahy et al., 2004).

No caso de haver a ocorrência de uma helmintose, é importante entender as suas manifestações clínicas, para que se possa fazer um diagnóstico correcto que será confirmado laboratorialmente. Seguidamente, são apresentados os diferentes sintomas e manifestações clínicas causados por diferentes espécies de Helmintas previamente referidas com maior importância médica, de acordo com o Atlas da Helminologia e Protozoologia Médica (Chiodini et al., 2003):

- ***Ascaris lumbricoides***: a migração larvar para os pulmões pode causar pneumonia com eosinofilia, enquanto que no estado adulto, os vermes podem causar obstrução da traqueia, das vias biliares e do intestino, podendo ainda estar associados ao desenvolvimento de apendicite, peritonite e pancreatite. As crianças fortemente infectadas podem expelir um aglomerado de vermes pela boca, podendo isto acontecer devido ao vómito ou a tosse;
- ***Trichuris trichiura***: a infecção por este parasita pode ser, em muitos casos, assintomática. Caso a infecção seja grave, este pode causar anemia, prolapso rectal, hematoquesia, disenteria e problemas de crescimento;

- ***Ancylostoma duodenale* / *Necator americanus*:** pode dar-se o aparecimento de prurido, decorrente da penetração de estados larvares através da pele, que podem migrar para os pulmões e causar pneumonia. Pode ainda haver hemorragia gastrointestinal oculta enquanto que, em infecções mais graves, pode desenvolver-se anemia ferropénica;
- ***Strongyloides stercoralis*:** à semelhança de outras espécies, este helminta pode causar prurido devido à penetração larvar através da pele. Uma vez que podem depois movimentar-se até aos pulmões podem causar pneumonia, podendo haver casos em que as larvas se alojam no cérebro ou noutros órgãos. Pode ainda haver a ocorrência de *larva migrans*, uma condição que causa urticária e desconforto que pode aparecer ao longo do tronco e nas nádegas. A infecção pode caracterizar-se pela ausência de sintomas ou manifestar-se apenas através desta condição, sendo que é ainda possível a ocorrência de diarreia, dor abdominal, edema e, por vezes, mal absorção. De frisar que a infecção por *Strongyloides stercoralis* pode causar bastantes complicações no indivíduo imunocomprometido, onde pode gerar efeitos como a hemorragia gastrointestinal, pneumonia, diarreia e ainda meningite e/ou septicémia;
- ***Taenia solium*:** apesar de, muitas vezes, as infecções por *Taenia solium* não apresentarem grandes problemas em indivíduos adultos, se a infecção for causada pela ingestão das suas formas larvares (cisticercos), a teniose pode gerar patologias musculares e neurológicas, pois é nestes tecidos que elas se fixam com maior frequência e, aquando da sua morte, levam a um processo reacionário que leva à inflamação, fibrose e posterior calcificação, podendo originar epilepsia ou outros sintomas relacionados com a perda de funcionalidade do Sistema Nervoso Central;
- ***Schistosoma spp*:** as infecções por Helminthas deste género costumam ser patologicamente complexas, pois apresentam vários estadios e diferentes tipos de sintomas que não são exclusivos da schistosomíase. A infecção dá-se pela penetração cutânea pela cercária (forma larvar) e pode ser acompanhado de dermatite que se manifesta pela formação de pápulas, máculas e vesículas e pelo prurido intenso que se desenvolve, sendo esta condição conhecida como “comichão de nadador”. A migração larvar, absolutamente necessária à sua maturação, desencadeiam sintomas como hepatoesplenomegália, dor

abdominal, febre e eosinofilia. Esta situação é comumente denominada de *Katayama* ou “febre do caracol”. A maturação dos ovos provenientes das larvas e os danos causados pela mesma dependem da carga parasitária inicial, mas geralmente acabam por levar à formação de um granuloma inflamatório que sofre, posteriormente, fibrose e calcificação.

Os resultados da infecção por *Schistosoma* spp. variam consoante a espécie do microrganismo que a causa, podendo, neste caso, ser o *S.haematobium*, o *S.japonicum*, o *S.mansoni* ou o *S.intercalatum* (Chiodini et al., 2003):

1. ***S. haematobium*** – causa a Schistosomose urinária, com possível envolvimento do sistema reprodutor. Esta helmintose, ao contrário das outras, não causa sintomas alérgicos e/ou tóxicos, mas leva a problemas urinários que afectam a bexiga e a uretra, podendo ocorrer hiperemia, hematúria, disúria, cistite que leva à formação de cálculos renais que podem, posteriormente, sofrer calcificação e originar um carcinoma das células escamosas, e ainda o aparecimento de fístulas e pápulas que podem levar à ulceração dos tecidos. No caso da Schistosomose genital, pode ocorrer hematospermia e a formação de lesões verrucosas na vulva;
2. ***S. mansoni* e *S. intercalatum*** – causam a Schistosomose intestinal. Os sintomas iniciais envolvem reacções tóxicas e alérgicas aquando da entrada deste helminta no organismo. De seguida, dá-se o envolvimento do intestino grosso e do recto, com a formação de pápulas, pólipos, úlceras, abscessos, fístulas e com a presença de ovos nas fezes. Em casos onde a bexiga é também afectada, os sintomas são idênticos aos da parasitose causada por *S.haematobium*. Para além disto, outros órgãos podem ser afectados, como o fígado (onde há entrada de ovos pela veia portal, o que causa um processo inflamatório que pode evoluir para fibrose), pulmões, cérebro e espinal medula, sendo ainda possível o aparecimento de varizes esofágicas e de sintomas como a ascite e a esplenomegália;
3. ***S.japonicum*** – causa a Schistosomose oriental. Os sintomas iniciais, idênticos aos do *S. mansoni*, podem causar miocardite e consequentemente a morte. As lesões intestinais causadas são

semelhantes à da Schistosomose intestinal, bem como o resto das lesões, apesar de, por vezes, o intestino delgado poder ser afectado.

## 2. Helmintas e o Sistema Imunitário

Nos últimos 70 anos têm-se verificado, no mundo industrializado, um aumento progressivo do número de patologias associadas a condições inflamatórias e/ou auto-imunes, como as Alergias, Doenças Inflamatórias Intestinais, Asma, Diabetes *Mellitus* e Esclerose Múltipla (EM), sendo que estas doenças continuam a ter pouca expressão nos países em vias de desenvolvimento (Elliott, Summers, & Weinstock, 2007). Este aumento em tão curto espaço de tempo é demasiado acentuado para se dever a alterações genótípicas na população ou ao avanço das técnicas de diagnóstico.

Hoje em dia, sabe-se que a predisposição para o desenvolvimento de doenças auto-imunes por parte de um indivíduo é influenciada, não só por factores genéticos, mas também por factores ambientais, sendo que é importante procurarmos entender quais os factores que podem despoletar essa auto-imunidade no nosso organismo. Um dos motivos prováveis poderá estar relacionado com o surgimento de um novo agente causador de doença que levou ao aumento da incidência da patologia auto-imune, mas é muito pouco provável que esse mesmo agente tenha levado ao aumento súbito de patologias como a doença alérgica, Doença Inflamatória Intestinal, Diabetes *Mellitus* e Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) (Zaccone & Cooke, 2013).

Outro motivo plausível é que houve uma grande alteração das condicionantes ambientais que nos circundam, o que levou à falta de exposição, por parte do sistema imunitário humano, a algumas infecções, anteriormente bastante comuns e medicamente importantes, sendo que, ao longo do tempo, acabou por modular a maneira como o sistema imunitário responde aos diversos estímulos. O aumento da auto-imunidade poderá estar relacionado com isto pois, uma vez que o nosso sistema imunitário evoluiu paralelamente com algumas destas infecções, provavelmente a causa terá sido a falta de “convivência” entre este e alguns agentes infecciosos, que levou à desregulação dos processos de imunidade humana (Zaccone & Cooke, 2013).

Esta hipótese é apoiada por uma teoria designada “*Hygiene Hypothesis*”, proposta pela primeira vez por Strachan (Okada et al., 2010). Esta teoria afirma que a diminuição da presença de estados infecciosos graves, durante a nossa infância, que devem ser

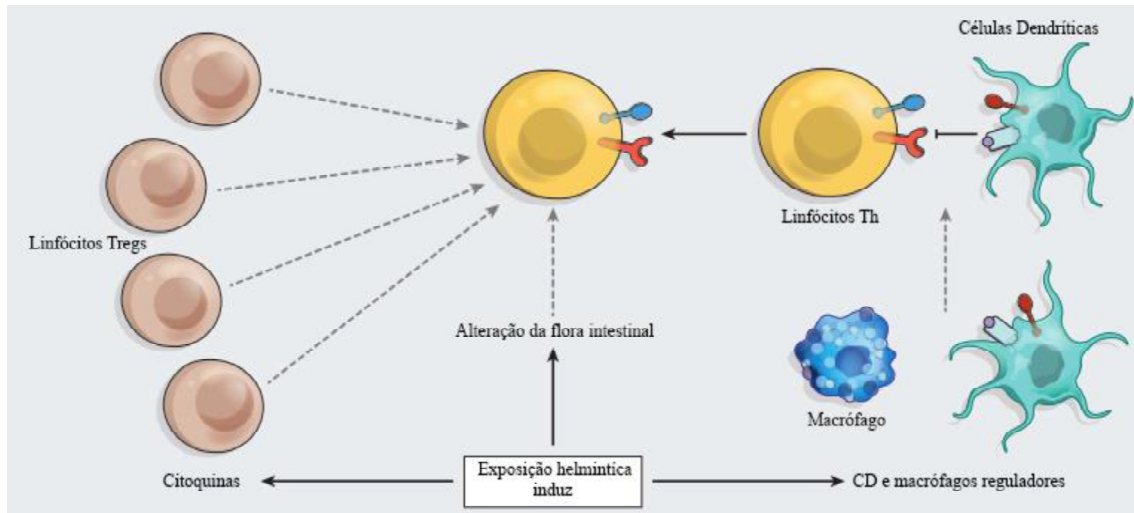
contraídos preferencialmente nessa faixa etária, pode impossibilitar o desenvolvimento de um sistema imunitário funcional e eficaz. Apesar do aumento do número de casos de patologias auto-imunes poder estar relacionado com a melhoria das condições de higiene, é complicado arranjar factos que o provem visto o *background* genético e ambiental de um indivíduo também influenciar bastante a presença ou ausência de auto-imunidade.

Por outro lado, este tipo de patologias é muito menos prevalente que a doença alérgica ou a Diabetes *Mellitus*, sendo, por isso, mais complicadas de caracterizar (van Riet, Hartgers, & Yazdanbakhsh, 2007). Um dos tipos de infecção que sofreu maior decréscimo nos países desenvolvidos foi a infecção por parasitas, entre as quais a infecção helmíntica, que, inversamente, levou ao aumento de respostas imunitárias inadequadas e/ou patológicas (McSorley et al., 2011)

Como já foi referido, os Helmintas e o organismo humano têm uma forte relação de proximidade há muito tempo. A relação que ambas as espécies mantêm há cerca de duzentos mil anos é exactamente igual à relação parasita-hospedeiro que se verifica em muitos outros casos de colonização por parte de organismos comensais que se encontram no nosso organismo e que interferem, por vezes, com os mecanismos inflamatórios e imunomodulatórios (Weinstock, 2012). Um dos princípios básicos que rege a área da Parasitologia é que um “bom” parasita traz sempre alguma vantagem que ajuda a manter a homeostasia do hospedeiro, pois se esta for afectada, tal pode acarretar graves danos para o microrganismo. Um bom parasita procura apenas desenvolver-se e perdurar o máximo tempo possível no hospedeiro, sem provocar a morte deste (Bashi et al., 2014).

Assim, e com vista a facilitar a sobrevivência no interior de um organismo imunocompetente, os Helmintas desenvolveram estratégias complexas que lhes permitem “ludibriar” a actividade imunológica do organismo hospedeiro, modulando e manipulando o sistema imunitário do mesmo (Helmby, 2009). Estas estratégias, segundo o reputado gastroenterologista Dr. Joel V. Weinstock, um dos primeiros cientistas a propor a capacidade que os Helmintas têm de influenciar o SI, englobam três vertentes imunomodulatórias, sendo que estas podem ser observadas na figura que se segue (Figura 1).





**Figura 1-** Processos imunomoduladores mediados por Helmintas. Ilustração das vertentes onde os parasitas actuam – adaptada de (Weinstock, 2012)

A primeira vertente tem a ver com a maneira como estes parasitas parecem induzir mudanças que activam Linfócitos T reguladores (linfócitos Tregs), capazes de suprimir a síntese e os processos imunológicos de Linfócitos T específicos para um determinado antígeno, diminuindo a intensidade da resposta imunitária e, consequentemente, a possibilidade de auto-imunidade, sendo que isto está também relacionado com o aumento de produção de moléculas reguladoras e anti-inflamatórias como a Interleucina (IL)-10 e o Factor de Transformação do Crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

A segunda vertente prende-se com evidências que sugerem que os Helmintas têm influência sobre outros tipos de células, nomeadamente sobre as células dendríticas e os macrófagos. Estas células têm como funções, entre outras, a apresentação de antígenos aos Linfócitos T helper 1 (Th1). Os macrófagos têm ainda a capacidade de influenciar a activação das células B e T. Ao prevenir a activação de Linfócitos Th1, a capacidade reactiva do sistema imunitário humano vê-se diminuída, o que leva a uma menor probabilidade de inflamação e/ou doença, uma vez que a sua principal tarefa é mediar reacções inflamatórias locais e intervir em processos de citotoxicidade, para além de serem importantes na resposta imune aos agentes patogénicos intracelulares.

A terceira vertente está relacionada com a forma como os Helmintas parecem alterar a composição bacteriana da flora intestinal. Estudos laboratoriais realizados em ratos que foram propositadamente infectados com Helmintas sugerem que estes podem promover o crescimento de populações de microrganismos com efeitos probióticos e que, assim, ajudam a manter as condições de homeostasia do intestino (Weinstock, 2012).

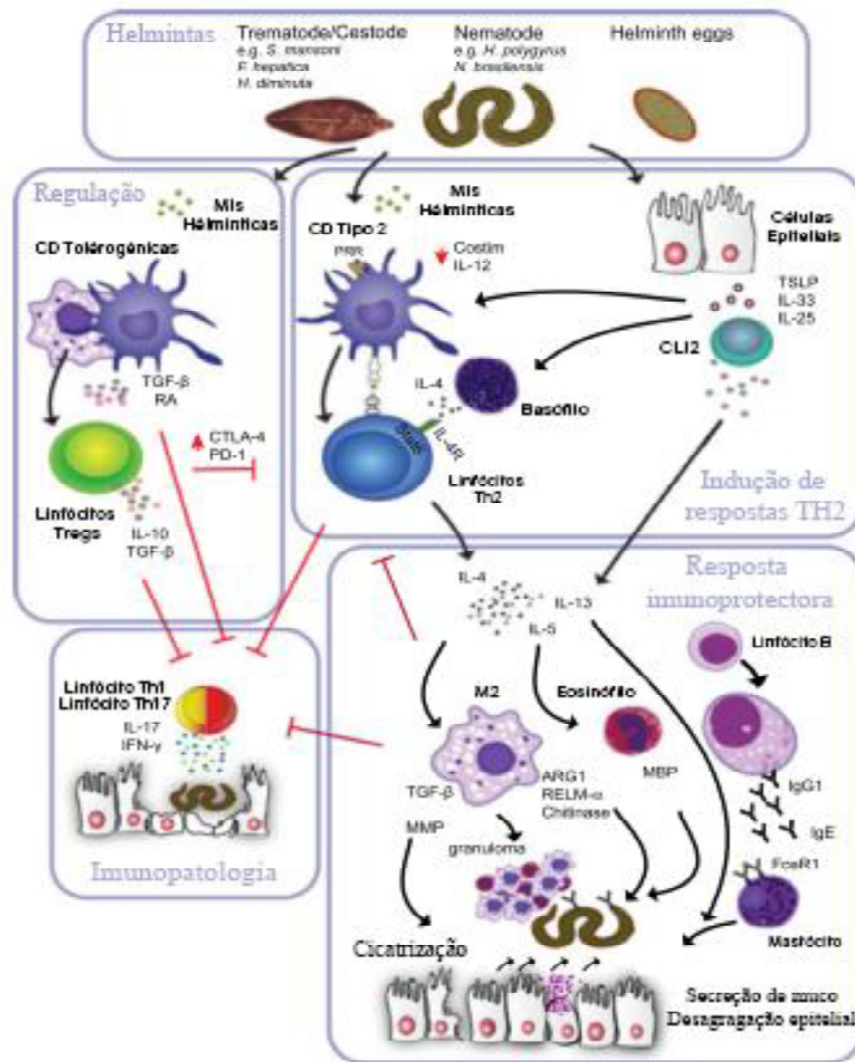
Estudos posteriores vieram trazer grandes desenvolvimentos à matéria de como os Helmintas conseguem influenciar o nosso SI. No entanto as supracitadas estratégias de imunomodulação parecem envolver também uma extraordinária complexidade de processos através dos quais as células do nosso SI, bem como as suas moléculas, interagem entre si.

Um exemplo que comprova esta pluralidade de interações é a maneira como o nosso organismo, mais propriamente a pele, interage à infecção percutânea por larvas de *Schistosoma*. Após a entrada destes parasitas é necessário que estes consigam prevenir uma inflamação tecidular acentuada ao promover a cicatrização, ao mesmo tempo que beneficiam a imunidade do hospedeiro. A forma larvar do parasita (*cercaria*), consegue penetrar na pele com auxílio da libertação de antígenos excretos/secretos (E/S) provenientes das glândulas acetabulares, produtos esses que têm uma acção estimuladora e reguladora sobre todas as células do SI inato do hospedeiro. De facto, estes antígenos E/S demonstraram ser promotores da produção de IL-10 reguladora por parte de Células Apresentadoras de Antígenos (CAA) em modelos experimentais com roedores (Sanin, Prendergast, Bourke, & Mountford, 2015).

O processo pelo qual o organismo estrutura uma resposta imunitária à infecção parasitária envolve mecanismos que conferem uma imunidade protectora, para além de promoverem a expulsão dos Helmintas. Esses mecanismos são mediados por complexas interações célula-célula entre Linfócitos Th2, Macrófagos tipo 2 (M2) – também designados por Macrófagos Alternadamente Activados (MAA), Células Linfóides Inatas (CLI) tipo 2, Células Dendríticas (CD) e eosinófilos, bem como pelas moléculas que estes secretam (Finlay CM, Walsh KP, & Mills KH, 2014).

No entanto, de entre todas estas interações, nenhuma parece ser tão marcadamente importante para as estratégias de imunomodulação que os Helmintas apresentam como a relação entre Linfócitos B, mais precisamente os Linfócitos B reguladores (linfócitos Bregs), descobertos há relativamente pouco tempo, e os Linfócitos Th1, Th2 e Th17 e Tregs (Tian et al., 2015).

A figura 2 ilustra a resposta imunitária que sucede à infecção pela maioria das espécies de Helmintas.



**Figura 2** - Resposta imunitária desencadeada por moléculas imunomodulatórias produzidas por Helmintas – adaptada de (Finlay CM, Walsh KP, & Mills KH, 2014)

A resposta imunitária mediada por Helmintas pode ser desencadeada pela produção e deposição de ovos, pela destruição de tecidos ou pela secreção de moléculas imunomodulatórias (MI) (Finlay CM et al., 2014) e pode ser escrutinada em 4 vertentes:

- I. **Deteção e activação de Linfócitos Th2** – a entrada do parasita na pele emite sinais que alertam o organismo e que resultam na produção de quitinases e de Proteínas Tipo Quitinase (PTQ). Esta família proteica degrada quitina, um polissacárido que é abundantemente encontrado na natureza (insectos, crustáceos, fungos, Helmintas, entre outros) mas não em mamíferos. As PTQ levam à secreção de IL-17 e à neutrofilia, essenciais na resposta imunopatológica (Allen, Sutherland, & Rückerl, 2015), e juntamente com as

citoquinas IL-25, IL-33 e TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*), activam as CLI2 que excretam citoquinas anti-inflamatórias como a IL-5 e IL-13 (Sakamoto et al., 2004). As moléculas imunomodulatórias produzidas pelos Helmintas conseguem activar receptores presentes nas CD e inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias, bem como a produção de IL-12 que, em conjunto com a indução da produção de IL-4 em basófilos por parte da TSLP, favorece a diferenciação de Linfócitos Th2 (Harnett, 2014);

**II. Resposta Imuno-Protectora** – Estes linfócitos Th2 produzem citoquinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-13 (Okada et al., 2010). A IL-4 e IL-5 actuam nos Linfócitos B, induzindo uma mudança nas Imunoglobulinas (IGs) expressas, motivando uma troca para IgG1 e IgE, esta última responsável pela activação de mastócitos que libertam moléculas inflamatórias (Harris & Gause, 2011). A IL-5 promove a multiplicação e activação de eosinófilos que produzem proteínas granulares como as MBP (*Major Basic Protein*) que podem causar danos ao parasita (Finlay et al., 2016). A IL-4 e IL-13 estimulam a diferenciação de M2, que assumem um papel preponderante na manutenção da homeostasia pois, em conjunto com os eosinófilos, encapsulam o parasita em granulomas tipo 2 com recurso à ligação por anticorpos. Para além disto, os M2 produzem moléculas que conseguem interagir directamente com os Helmintas, gerando efeitos nocivos nestes, como é o caso de RELM- $\alpha$  e das quitinases. A Arginase também produzida pelos M2 mata os Helmintas uma vez que provoca o esgotamento de L-arginina, suprimindo as fontes nutricionais destes parasitas (Allen et al., 2015). Estes macrófagos desempenham ainda um papel importante na promoção da renovação tecidular durante a infecção através da libertação de TGF- $\beta$ , RELM- $\alpha$  e de metaloproteinases matriciais enquanto que a IL-13 exerce um efeito directo na mucosa, causando a remoção de tecido epitelial e a secreção de muco, ajudando assim a expelir os Helmintas (Faz-lópez, Morales-montor, & Terrazas, 2016);

**III. Imunopatologia** – a imunopatologia decorrente de uma infecção por Helmintas verifica-se quando estes causam danos nos tecidos. As PTQ levam à secreção de IL-1 que por sua vez leva à secreção de IL-17, responsável pela neutrofilia e pela produção de Interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Allen et al., 2015). A desregulação na resposta Th1/Th17, com a possível supressão da actividade de Linfócitos Th2, pode gerar um processo inflamatório que conduz a uma grave destruição dos

tecidos, podendo estar desta forma associada à expressão de auto-imunidade (Zaccone & Cooke, 2013). Por outro lado, uma resposta Th2 exacerbada também pode levar a estados imunopatológicos, graças à eosinofilia por si provocada, em conjunto com a contracção do músculo liso das vias respiratórias, à produção de muco e à expressão de IgE (Erb, 2009). A possibilidade de usar esquemas terapêuticos com recurso a Helmentas e/ou aos seus produtos excretados prende-se com a capacidade destes de activar preferencialmente um processo imunitário do tipo Th2 em detrimento da imunidade mediada por Linfócitos Th1, associado ao aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, que diminuem a quantidade de IL-17, enquanto promovem a diferenciação de Linfócitos T e B reguladores (Versini, Bizzaro, & Shoenfeld, 2015);

**IV. Imunoregulação** - os Helmentas induzem respostas imunoregulatórias para evitar a imunopatologia inerente ao processo inflamatório, que pode gerar efeitos nefastos no hospedeiro e parasita, mas também para suprimir respostas Th2 inatas, utilizadas para os eliminar e/ou expulsar do nosso organismo (Johnston et al., 2015). Os Helmentas, através das suas MI, provocam uma diminuição na intensidade da resposta exercida pelos Linfócitos T ao aumentar, nestas células, a expressão de moléculas proteicas co-inibitórias, como (Kessel et al., 2012) :

- o *Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4)*, que dificulta o reconhecimento dos antígenos por parte dos Linfócitos T específicos e, consequentemente, o seu processo de activação;
- a *Programmed cell death protein 1 (PD-1)*, uma proteína responsável pela indução de apoptose em Linfócitos T específicos nos gânglios linfáticos e pela inibição, simultânea, da apoptose dos linfócitos Tregs;
- a *Forkhead box p3 (Foxp3)*, um marcador de expressão superficial em linfócitos Tregs, responsável pela manutenção do balanço na diferenciação entre Linfócitos Th1 e Linfócitos Th2.

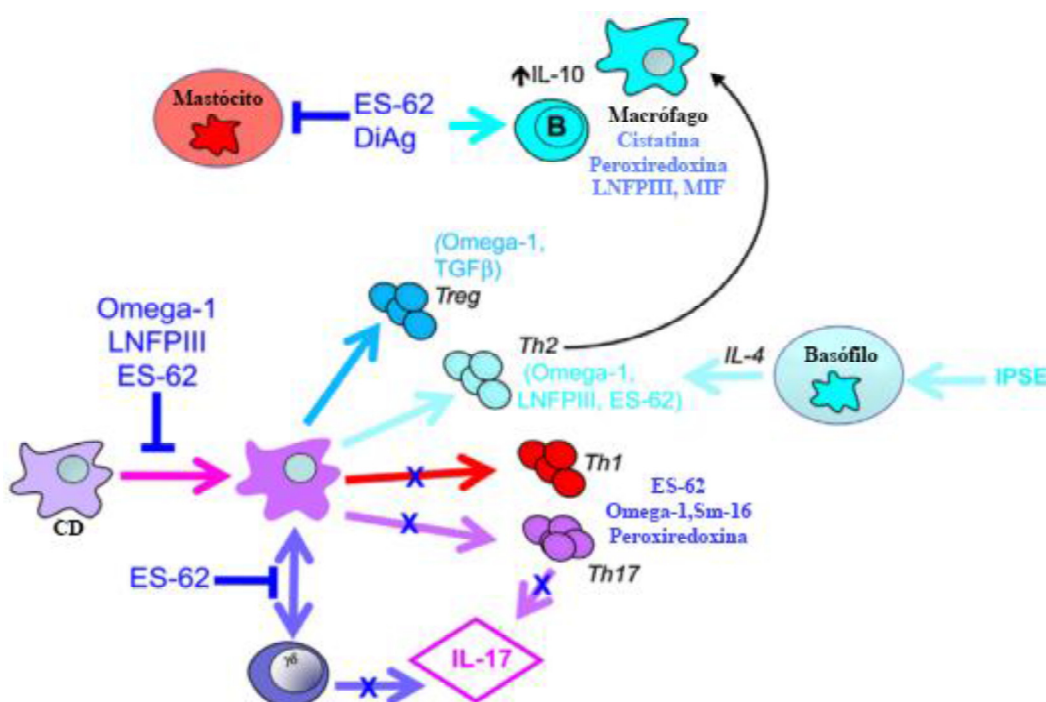
Os M2 também são capazes de regular a actividade de Linfócitos T, através da Arginase e da sua capacidade de suprimir respostas imunitárias mediadas por células T reactivas (Munder, 2009). As MI produzidas por Helmentas têm ainda a capacidade de promover a diferenciação de CD que induzem, maioritariamente, a diferenciação de Tregs

(Méndez-samperio, 2016). Os linfócitos Tregs são responsáveis pela produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- $\beta$ , que têm a capacidade de regular tanto os Linfócitos Th2 anti-parasitários como a resposta inflamatória mediada por Linfócitos Th1/Th17, implicada na imunopatologia (Niloofar et al., 2014).

Após a descrição das 4 vias pelas quais os Helmintas podem exercer os seus efeitos imunomoduladores, é necessário tirar três ilações relevantes:

- A infecção por Helmintas é caracterizada pelo aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, IL-5 e IL-10. Estas, por sua vez, demonstram que as respostas Th2 são as mais prevalentes neste tipo de infecção, servindo desta forma para regular negativamente o SI, prevenindo os processos inflamatórios mediados por Linfócitos Th1 que podem causar danos tanto ao parasita como ao hospedeiro (Mendlovic, Cruz-Rivera, Ávila, Vaughan, & Flisser, 2015);
- Apesar de os Linfócitos Th serem as principais células que são influenciadas pelos mecanismos imunomoduladores apresentados pelos Helmintas, estes são capazes de influenciar várias células do SI (basófilos, eosinófilos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos), contribuindo para uma regulação eficaz dos processos envolvidos na resposta imunitária (Finlay CM et al., 2014), sendo que estes parasitas também podem gerar uma resposta Th2 exacerbada que pode conduzir a estados imunopatológicos (Erb, 2009);
- As MI excretadas pelos Helmintas, também designadas por produtos de excreção/secreção (E/S), exercem preferencialmente os seus efeitos nestas células, que por sua vez vão levar à diferenciação e activação de linfócitos Tregs e de Linfócitos Th2 e à inibição da proliferação de Linfócitos Th1 (Finlay CM et al., 2014).

Na figura 3 encontra-se representada a maneira como os antígenos E/S exercem a sua função nas células supramencionadas por forma a controlar a proliferação e diferenciação de Linfócitos T.



**Figura 3** - Efeitos dos antígenos E/S nas células do SI – adaptada de (Harnett, 2014)

Actualmente encontra-se descrita uma grande variedade de E/S produzidos por parte dos Helminths. No entanto, serão apenas apresentados os antígenos que se encontram mencionados na figura 3: Omega-1, antígeno que é libertado por ovos de *Schistosoma*; LNFPIII (Lacto – N – Fucopentose III); a peroxirredoxina excretada por *Fasciola hepatica*; *migration inhibitory factor* (MIF) produzido pelos macrófagos em caso de infecção pelo nematoda *Brugia malayi*; Cistatinas, moléculas inibidoras de proteases produzidas por nematodes e *DiAg*, antígeno produzido pela espécie *Dirofilaria immitis* (Robinson, Dalton, O'Brien, & Donnelly, 2013).

No entanto, o primeiro E/S a demonstrar a capacidade de induzir a prevalência de respostas imunitárias Th2, sendo por isso o mais comum e o mais estudado de todos os produtos excretados por Helmintas, é o ES-62, uma glicoproteína produzida pelo nematode *Acantocheilonema viteae* (Rodgers et al., 2014).

Ao observarmos o mecanismo de acção de todos estes E/S, é possível perceber que exercem as suas actividades imunomoduladoras da seguinte forma:

1. Interagindo com as CD, induzindo a expressão de moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas, controlando assim a polarização responsável pela diferenciação de Linfócitos T, quer na indução de respostas mediadas por Th2/Tregs quer pela capacidade de diminuir a intensidade das respostas Th1/Th7 pró-inflamatórias (Méndez-samperio, 2016);
2. Promovendo a secreção de IL-4 por parte dos basófilos, estimulando a activação de Linfócitos Th2 (Harris & Gause, 2011);
3. Provocando a libertação da citocina anti-inflamatória IL-10 por parte de M2 e/ou Linfócitos B causando, simultaneamente, a inibição da formação de granulomas e de respostas mediadas por citocinas pró-inflamatórias por parte dos mastócitos (Faz-lópez et al., 2016)
4. Para além disto, o ES-62 , ao inibir as respostas mediadas por IL-17, actua segundo um mecanismo que envolve uma interacção entre as CD e os Linfócitos T  $\gamma\delta$ , podendo assim bloquear directamente o desenvolvimento de Linfócitos Th17 (Rodgers et al., 2014).

Após observação da forma como os E/S produzidos por Helminthas interagem com o nosso SI, pode-se constatar que as células mais importantes envolvidas nestes mecanismos e na sua capacidade de diminuir a intensidade da resposta imunitária são os Linfócitos Th e especialmente os Tregs, pela sua capacidade de inibir processos pró-inflamatórios mediados por Th1, contribuindo assim para o controlo da morbilidade e para a diminuição de resistências em caso de reinfecção, permitindo aos Helminthas colonizarem os hospedeiros múltiplas vezes (Finlay CM et al., 2014).

Actualmente, está estabelecido que os linfócitos Tregs desempenham um papel muito importante no controlo das respostas imunitárias e na manutenção da homeostase em condições patológicas de doença oncológica, auto-imune e inflamatória, principalmente devido à produção de citocinas imunossupressoras como a IL-10 e o TGF- $\beta$  (Niloofar et al., 2014). No entanto, desenvolvimentos recentes sobre a maneira como os Helminthas interagem com o nosso SI vieram demonstrar que os Linfócitos B, especialmente os linfócitos Bregs, desempenham uma função de muito maior relevância



que os linfócitos Tregs, pois estão envolvidos no processo de maturação e activação destes últimos (Kessel et al., 2012).

A manutenção de homeostasia, no que toca ao bom funcionamento do SI, é proporcionada pela boa coordenação de funções reactivas e reguladoras por parte de várias células. No que toca aos Linfócitos B, estas funções são desempenhadas, respectivamente, através da produção de anticorpos e citocinas. Os linfócitos Bregs exercem a sua função reguladora ao produzirem citocinas anti-inflamatórias sendo a produção de IL-10 uma das suas funções mais caracterizadas e que demonstrou ser importante no controlo de reacções auto-imunes (Vitale, Gaetano; Mion, 2014).

Há três tipos de Linfócitos B reguladores, sendo que cada um é classificado consoante a citocina que produz: os Linfócitos B produtores de Foxp3, os Linfócitos B produtores de TGF- $\beta$  e os Linfócitos B produtores de IL-10, designados, respectivamente, por B-Foxp3, Br3 e Br1, sendo que este último tipo pode ser designado também por B10, devido ao facto de estes produzirem a maior parte de IL-10. Os linfócitos B10, presentes tanto em roedores como humanos, e a sua funcionalidade em relação à produção de IL-10, são factores cruciais para a regulação negativa de inflamação e doença auto-imune, assim como para a manutenção de respostas imunitárias inatas e adaptativas (Labuda et al., 2013).

Hoje em dia, apesar de os linfócitos Bregs terem sido apenas descobertos recentemente, sabe-se que estes inibem a activação e diferenciação de Linfócitos Th, Linfócitos Tc (Linfócitos T citotóxicos) e de Linfócitos NKT (*Natural Killer T*) através da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ . Para além disto, as células B10 são ainda capazes de induzir a expressão de Foxp3 nos linfócitos Tregs e de inibir a proliferação de Linfócitos Th1 e Th17 em situações inflamatórias agudas (Van Der Vlugt et al., 2014).

O processo de maturação e activação dos linfócitos Bregs ainda não é claro, mas parece envolver a ligação de moléculas a receptores específicos – *Toll -like receptors* (TLR) – expressos na sua superfície. Vários estudos em roedores demonstraram que a activação de TLR2, TLR4 E TLR9, por exemplo através de, respectivamente, agonistas TLR2 produzidos por *Helicobacter felis* e antígenos bacterianos como o LPS (Lipossacárido), um ligando TLR4, e os oligonucleótidos CpG, um ligando TLR9, é uma potente indutora da produção de IL-10 por parte de linfócitos Bregs, podendo, no entanto,

desencadear também respostas inflamatórias. Os linfócitos Bregs, e a maneira como estes são activados pelos TLR, parecem assim influenciar diversos aspectos da imunidade inata e adaptativa, influenciando (Vitale, Gaetano; Mion, 2014) :

- A actividade dos Monócitos na libertação de citocinas pró-inflamatórias;
- O equilíbrio Th1/Th2, através da inibição da proliferação de Linfócitos T específicos para antígeno;
- Respostas reguladoras, através da indução da proliferação e/ou recrutamento de Linfócitos T *Foxp3*<sup>+</sup> e de Linfócitos T produtores de IL-10.

Em suma, os Linfócitos B regulam a resposta imunitária através da produção de anticorpos específicos para o antígeno. Os linfócitos Bregs têm a capacidade de regular negativamente as respostas imunitárias baseadas por Linfócitos T. Através da produção de citocinas anti-inflamatórias, os linfócitos Bregs parecem actuar, na resposta imunitária, antes dos linfócitos Tregs, possuindo assim um maior controlo que estes últimos em patologias auto-imunes, alérgicas, oncológicas, transplantares e parasitárias. É possível então estipular um possível uso terapêutico para os Helmintas e/ou os seus produtos pela sua capacidade de promover a diferenciação de linfócitos Bregs, que por sua vez estimulam a proliferação de linfócitos Tregs, induzem a libertação de IL-4/IL-10 e suprimem a libertação de IL-17, inibindo assim o desenvolvimento de respostas inflamatórias mediadas por Linfócitos T (Tian et al., 2015).

### **3. Terapêutica helmíntica *versus* Terapêutica Farmacológica**

Antes de começar a abordar a actividade terapêutica que os Helmintas podem exercer sobre as mais diversas patologias, irão ser abordadas as diferenças entre as terapias à base de Helmintas e dos seus produtos com as terapias farmacológicas. Infelizmente, os únicos estudos comparativos disponíveis relativamente a Helmintas e a fármacos visam comparar a melhor terapêutica farmacológica para lidar com helmintoses, não se focando sobre as propriedades terapêuticas destes parasitas e/ou dos seus produtos (e a possível ausência de efeitos secundários) comparativamente com os medicamentos.

É importante referir que esta falta de estudos comparativos pode dever-se ao facto de ainda não existir comercialização, sendo que a utilização deste tipo de terapia “alternativa” só foi realizada em casos experimentais. Felizmente, e como único material bibliográfico que possuo para abordar esta vertente da monografia, tenho em

minha posse um estudo efectuado, em 2013, por Cornelia Tilp e seus colaboradores (Tilp, Kapur, Logging & Erb, 2013) que visa abordar os pré-requisitos necessários para que a indústria farmacêutica possa desenvolver e comercializar terapêuticas com recurso a Helminthas, bem como aos seus produtos.

A proporcionalidade inversa entre as infecções helmínticas e as doenças alérgicas e auto-imunes é intrigante. Vários estudos epidemiológicos mostraram correlações inversas entre helmintoses e patologias como a Doença de Crohn, asma, eczema, colite ulcerosa, entre outras (Sima et al., 2016). Estudos experimentais em roedores mostraram eficácia em patologias como a diabetes tipo 1, encefalomielite auto-imune, Esclerose Múltipla (EM), entre outras doenças, descrevendo também o poder imunomodulador inerente aos produtos excretados por Helminthas (Rick M. Maizels & McSorley, 2016). Hoje em dia, existem numerosas evidências das interações imunoreguladoras entre hospedeiro-parasita e de como estas podem ser alvo de intervenções tendo como objectivo o tratamento de inúmeras doenças (Tilp et al., 2013). Sendo assim, porque motivo não há um maior investimento, por parte das indústrias farmacêuticas, no desenvolvimento e possível comercialização de terapias com recurso a Helminthas?

Antes de mais é necessário abordar os desafios que a indústria farmacêutica enfrenta nos dias de hoje, para se perceber o porquê de a indústria farmacêutica não estar muito interessada no desenvolvimento deste tipo de terapias. Em primeiro lugar, a resistência relativamente a novos conceitos terapêuticos e na sua implementação clínica têm vindo a crescer, apesar de ser cada vez mais comum a existência de modelos experimentais em animais que demonstram que estes podem trazer vantagens face aos actuais. Para além disto, a eficácia demonstrada por estas novas terapêuticas relativamente ao padrão estabelecido ou a outros medicamentos disponíveis no mercado (incluindo genéricos) muitas vezes não é suficiente para que haja aprovação por parte das autoridades competentes, dada a dificuldade para assegurar um apropriado acesso ao mercado e reembolso dos custos de investigação, que permita um preço de venda competitivo. Estes motivos devem-se ao facto de as farmacêuticas, hoje em dia, enfrentarem mais dificuldades para assegurar que um novo conceito terapêutico tem elevada percentagem de ser bem sucedido na prática clínica (Tilp et al., 2013).

Os Helminthas, apesar das reconhecidas propriedades anti-inflamatórias e reguladoras dos seus produtos e de estudos epidemiológicos demonstrarem uma correlação inversa entre helmintoses e doenças auto-imunes ou inflamatórias, também acarretam certos

obstáculos que, detectados após uma observação mais cuidada sobre alguns estudos, podem inviabilizar um aumento de investimento no desenvolvimento deste tipo de terapia:

1. Nem todas as espécies de Helmintas são associadas a uma diminuição da auto-imunidade ou inflamação, havendo espécies como a *Ascaris lumbricoides* ou o *Necator americanus* que podem causar, entre outras manifestações, endocardite;
2. O efeito benéfico comprovado das helmintoses em estudos epidemiológicos nem sempre se verificou em ensaios clínicos;
3. Mesmo que hajam estudos como os supramencionados, existem indivíduos infectados que não apresentam protecção relativamente a patologias auto-imunes ou inflamatórias;
4. O potencial terapêutico dos Helmintas foi comprovado em situações onde o hospedeiro já se encontrava infectado, previamente a uma suposta reacção inflamatória e/ou auto-imune. O tratamento de patologias graves deste tipo com recurso a Helmintas e/ou aos seus produtos é um assunto completamente diferente e muito mais difícil, dado que a intervenção em respostas imunitárias é intrinsecamente mais complexa do que prevenir que estas se manifestem.

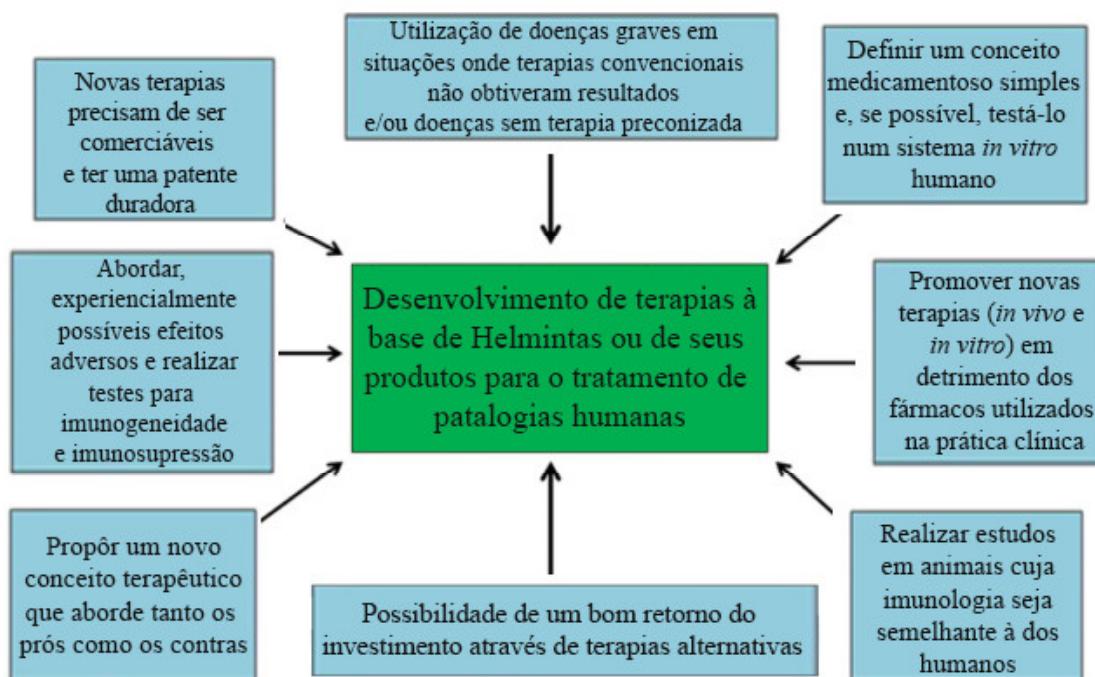
Apesar do conhecimento científico acerca dos processos de regulação imunitária ter aumentado significativamente nos últimos anos, nenhum avanço terapêutico foi desenvolvido e aplicado em humanos, com a excepção da melhoria em imunoterapias para doenças atópicas, e isto deve-se ao facto de a regulação imunitária ser um processo efémero e que necessita de uma permanente indução. No caso dos Helmintas, os efeitos imunossupressores estimulados por estes cessaram após a eliminação dos parasitas, sendo que induzir processos de regulação imunitária em caso de ausência destes têm-se vindo a mostrar extremamente difícil (Tilp et al., 2013).

Para além disto, parecem existir outros motivos que potenciam a possível falta de interesse por parte da indústria farmacêutica em investir na investigação de novas terapêuticas à base de Helmintas, tais como (Tilp et al., 2013):

- **A falta de qualidade inerente aos Helmintas e aos seus produtos** – a grande maioria pode encontrar-se contaminada com bactérias, endotoxinas, ou outro contaminante que pode alterar os resultados de ensaios clínicos;

- **Complicações relacionadas com o *Marketing*** – mesmo que este tipo de terapêutica venha a apresentar uma grande eficácia, esta precisa ainda de ser prática e aceitável por parte dos doentes, para além do factor intrínseco à indústria farmacêutica, que tem de produzir, embalar, armazenar, distribuir e utilizar o medicamento, tudo sem comprometer a consistência e a fiabilidade;
- **Existência de Medicina Personalizada e Biomarcadores** – a eficácia de uma terapêutica varia de paciente para paciente devido aos diferentes fenótipos. Significa isto que dependendo do alvo sobre o qual recai uma nova alternativa terapêutica, diferentes pacientes podem retirar diferentes tipos de benefícios da mesma graças à diferença do fenótipo imunológico;
- **Dificuldade em preencher requisitos para testar Helminthas ou produtos à base destes em animais que reproduzam fielmente e na altura certa, as condições patológicas humanas** – as terapêuticas devem ser direccionadas para tratar as doenças, em vez de as prevenir. Hoje em dia, muitos dos fármacos utilizados nas patologias auto-imune e alérgica apenas tratam os sintomas, não curando as doenças. Estudos realizados com recurso a Helminthas demonstraram que a maior eficácia na prevenção da doença em animais foi obtida quando a terapia foi administrada antes do desenvolvimento da doença, no entanto, deve-se utilizar animais que permitam mimetizar, parcialmente, o SI humano;
- **Falta de reprodutibilidade de dados científicos publicados previamente** – nem sempre os estudos realizados pela indústria farmacêutica demonstram os mesmos resultados obtidos, previamente, por estudos independentes;

De seguida, é apresentado um esquema (Figura 4), elaborado por Cornelia Tilp e seus colaboradores, que visa sugerir algumas ideias para potenciar o desenvolvimento de terapias à base de Helminthas e/ou dos seus produtos:



**Figura 4** - Formas de potencializar a investigação sobre o Uso Terapêutico dos Helmintas - adaptada de (Tilp, Kapur, Logging, & Erb, 2013)

Para que haja estudos comparativos entre a terapêutica farmacológica e a terapêutica helmíntica para um determinado grupo de patologias, é necessário primeiro que a indústria farmacêutica comece a prestar mais atenção a este tipo de terapia “alternativa” e que promova, por exemplo, a sua utilização em pacientes asmáticos que demonstraram resistência aos esteróides ou pacientes que demonstraram refracção de TNF- $\alpha$  em situações Artrite Reumatóide (AR), Esclerose Múltipla ou Doença Inflamatória Intestinal, assim como em doenças para as quais não haja nenhum tipo de fármaco adequado. É necessário provar que um fármaco formulado à base de Helmintas pode efectivamente ser eficaz em modelos humanos e não apenas em animais. Assim, considera-se que são necessários mais desenvolvimentos para que possa ser possível a aplicação clínica de terapias à base de Helmintas e/ou dos seus produtos (Tilp et al., 2013).

#### 4. Uso Terapêutico dos Helmintas

Os Helmintas co-existem com o ser humano desde que este surgiu há duzentos mil anos atrás, sendo que estes parasitas evoluíram concomitantemente com o SI dos mamíferos ao longo dos milénios, desenvolvendo assim mecanismos que lhes permitem modular a

maneira como este funciona com o objectivo de promover a sua sobrevivência (Helmby, 2015).

Estes mecanismos acarretam a capacidade de alterar a resposta imunitária do hospedeiro, num processo que pode influenciar o desenvolvimento de outras doenças. Primeiro, porque a resposta imunitária gerada para combater a infecção helmíntica pode prevenir o desenvolvimento das reacções imunopatológicas implicadas nas doenças auto-imunes. Segundo, porque os Helmintas excretam produtos que possuem capacidades imunomodulatórias, isto é, que possuem a capacidade de regular, directamente, a função imunitária do hospedeiro (El-Malky, Nabih, Heder, Saudy, & El-Mahdy, 2011).

Ao alterar e/ou suprimir respostas imunitárias, estes demonstraram que podem ser úteis para ajudar a controlar respostas pró-inflamatórias excessivas no hospedeiro pois estudos com recurso a animais e a ensaios pré-clínicos deixaram indicações de um efeito benéfico das helmintoses sobre doenças como a DII, a Asma, a EM, a doença alérgica, entre outras doenças do foro auto-imune e inflamatório. Assim, a terapêutica helmíntica tem vindo a ser equacionada enquanto possível método de tratamento para doenças do tipo supramencionado (Helmby, 2015).

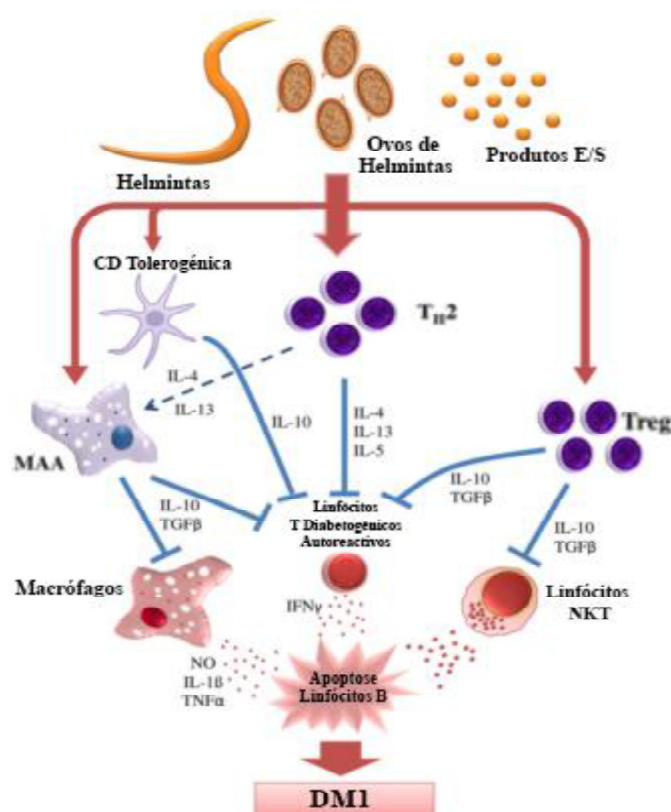
Assim, de seguida, será elucidada a maneira de como os Helmintas e/ou os seus produtos podem aperfeiçoar a terapia de inúmeras doenças, sendo que irei abordar cada tipo de patologia individualmente para melhor perceber quais os contributos que vários estudos de diversos académicos vieram trazer à vontade de aplicar estes parasitas na terapêutica de inúmeras doenças de elevada mortalidade e morbilidade.

#### **4.1 Terapêutica helmíntica na Diabetes**

A Diabetes *Mellitus*, ou simplesmente Diabetes, é uma patologia que afecta, mundialmente, mais de 347 milhões de pessoas, sendo uma doença altamente incapacitante que deteriora as condições de vida dos afectados, que necessitam de medicação vitalícia, com todos os danos económicos e sociais que esta acarreta. Actualmente, e apesar do investimento e pesquisa envolvidos na procura por uma terapêutica viável, ainda não existe nenhum fármaco que tenha a capacidade de curar

e/ou prevenir o desenvolvimento da Diabetes, bem como a sua progressão (Ajendra, Berbudi, Hoerauf, & Hübner, 2016).

A Diabetes é uma patologia crónica que aumenta a probabilidade de outras doenças resultantes das complicações circulatórias, que afectam órgãos como os rins, o fígado, os olhos, o cérebro e o coração e que se manifesta de duas formas: tipo 1 e tipo 2. A Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune crónica e progressiva que é caracterizada pela destruição das células  $\beta$  que constituem os ilhéus de *Langerhans* no pâncreas, responsáveis pela produção de insulina, por parte dos Linfócitos Tc, por Linfócitos Th1 produtores de IFN- $\gamma$  e por macrófagos (Méndez-samperio & Arana, 2015). Em baixo, é possível observar a Figura 5 que explica os mecanismos através dos quais os Helmintas conseguem prevenir o desenvolvimento de DM1.



**Figura 5** - Intervenção terapêutica dos Helmintas e seus produtos na prevenção do desenvolvimento da DM1 – adaptada de (Achim et al., 2015)

Ao observarmos a figura 5, podemos concluir que as respostas imunitárias induzidas pelos Helmintas, quer através da deposição de ovos quer pelos antígenos produzidos por estes sobre a forma de produtos E/S, levam à proliferação de Linfócitos Th2, de M2/MAA, de linfócitos Tregs e de CD tolerogénicas, cuja interacção através de reacções cruzadas resulta num aumento de produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- $\beta$  que influenciam a resposta imunitária ao potenciar respostas



imunitárias do tipo Th2. Estas respostas anti-inflamatórias são responsáveis pela diminuição de actividade de Linfócitos NKT, de macrófagos e de Linfócitos T diabetogénicos autoreactivos, células promotoras da apoptose em células  $\beta$  dos ilhéus de *Langerhans*, prevenindo assim a destruição das mesmas, a causa etiológica da DM1 e da incapacidade de produção de insulina (Achim et al., 2015).

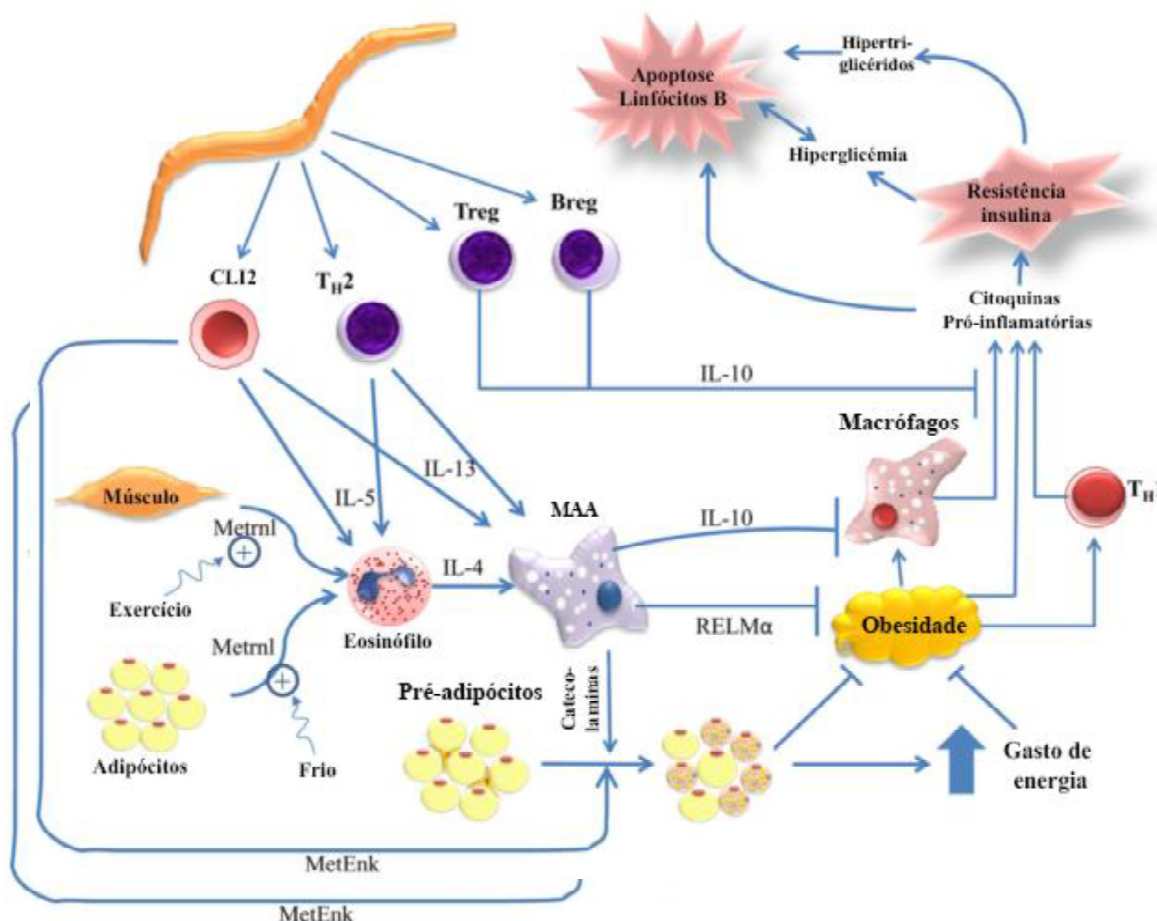
Por outro lado, a Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), ao invés de ser causada pela destruição das células pancreáticas produtoras de insulina, é causada por processos inflamatórios que geram resistência à insulina e levam ao desenvolvimento de DM2, representando cerca de 90% dos casos de Diabetes, estando esta patologia fortemente relacionada com a Obesidade. Em indivíduos saudáveis não-obesos, a fracção estromal vascular do tecido adiposo profundo é constituído por células associadas a respostas Th2 e outras células anti-inflamatórias como os linfócitos Tregs, os M2 e os eosinófilos que mantêm a capacidade do organismo de estimular a produção de insulina, bem como de regular a sua sensibilidade (Wiria et al., 2015).

A hipertrofia e hiperplasia que se verifica nos adipócitos de indivíduos obesos resulta num aumento do stress metabólico que se manifesta através da libertação de ácidos gordos livres, do aumento das situações de hipoxia, do stress ao nível do retículo endoplasmático e da entrada, em circulação, de grupos reactivos oxidáveis que acabam por causar morte celular. Estes adipócitos necróticos activam o recrutamento de macrófagos que levam ao desenvolvimento de baixos graus de inflamação e a mudanças na constituição do tecido adiposo. Estas alterações envolvem a redução dos tipos celulares supramencionados, sendo que a proliferação de macrófagos e células B produtoras de anticorpos conduz ao aumento da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que, em conjunto com o aumento de ácidos gordos livres em circulação, promovem o desenvolvimento de inflamação em órgãos onde a insulina actua como os rins ou o fígado (Wiria et al., 2015).

Esta inflamação, após ser potenciada por mecanismos envolvendo Linfócitos Th1, leva ao desenvolvimento de resistência à insulina que, por sua vez, estimula as células  $\beta$  do pâncreas na produção de mais insulina, como mecanismo compensatório, podendo causar hiperinsulinémia. O aumento da resistência à insulina, aliado a este mecanismo, provoca a exaustão destas células o que, em conjunto com os danos resultantes da infiltração no pâncreas de macrófagos recrutados devido à necrose de tecido adiposo, leva à destruição irreversível das células  $\beta$  produtoras de insulina, situação clínica que

depois resulta na manutenção de hiperglicemia e da DM2 (Berbudi, Afiat; Ajendra, Jesuthas; Wardani, Ajeng P.F.; Hoerauf, Achim; Hubner, Marc P. 2015).

De seguida, à semelhança da forma como foi abordada a DM1, podemos encontrar a Figura 6, que elucida a maneira de como os Helmintas e/ou os seus produtos podem ser úteis na prevenção do desenvolvimento de DM2.



**Figura 6** - Intervenção terapêutica dos Helmintas e seus produtos na prevenção do desenvolvimento da DM2 – adaptada de (Achim et al., 2015)

Através da análise da figura 6, é possível depreender que a prevenção da DM2 por parte dos Helmintas é alcançada através de 4 mecanismos (Achim et al., 2015) :

- 1. Indução de respostas imunitárias Th2 e a produção de IL-10 aumenta a sensibilidade à insulina** – helmintoses por *Schistosoma mansoni* em roedores com obesidade induzida por controlo da dieta demonstraram uma redução da resistência à insulina, provocando, ao mesmo tempo, uma migração de eosinófilos e M2 para o tecido adiposo branco, uma diminuição do ganho de

peso e da massa gorda. Para além disto, certos estudos demonstraram que a IL-10 exerce um papel importante ao incrementar a sinalização de insulina através da redução da infiltração de macrófagos e da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ ;

**2. Inibição da adipogénese** – estudos epidemiológicos efectuados em áreas rurais na China demonstraram uma correlação inversa entre indivíduos previamente infectados por *Schistosoma* e indivíduos sem historial de patologia helmíntica, sendo que os primeiros apresentavam um peso inferior aliada a uma baixa prevalência de diabetes e síndrome metabólica assim como níveis inferiores de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Experiências realizadas com recurso a modelos animais com obesidade induzida pela dieta demonstraram que, após estes serem infectados por vários Helmintas (*Nippostrongylus brasiliensis*, *Litomosoides sigmodontis*, entre outros), houve uma diminuição do ganho de peso em dietas altamente calóricas, quer pela perda de peso provocada quer pela diminuição de tecido adiposo. O motivo pelo qual parecem induzir tais alterações parece residir na produção de RELM- $\alpha$  por parte dos M2, que por sua vez inibe a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros;

**3. Alteração de tecido adiposo branco para tecido adiposo castanho, aumentando o gasto de energia** – diferente do tecido adiposo branco, o tecido adiposo castanho tem como principal função a dissipação de energia química sobre a forma de calor. Este processo previne a hipotermia e é mediado por proteínas mitocondriais. Estes adipócitos de aspecto acastanhado resultam de alterações provocadas no tecido adiposo branco por, entre outros estímulos, exposição ao frio e/ou exercício físico, que levam o organismo a produzir hormonas (Metrn1) que participam na activação de eosinófilos. Devido à sua capacidade de produzir energia através da eliminação de gordura sob a forma de calor, a alteração de tecido adiposo branco para este pode ser uma alternativa a considerar na prevenção do desenvolvimento de obesidade e, consequentemente, de DM2. Esta alteração é promovida por M2 e eosinófilos, pois a libertação de IL-4 destes últimos leva a uma polarização nos M2, que aumenta a produção de catecolaminas, estimulando os receptores  $\beta$ - adrenérgicos e a termogénese. Este

processo aprimora a tolerância à glucose, devido à transformação de tecido adiposo branco em castanho e à maior produção de energia;

4. **Prevenção da destruição das células  $\beta$  dos ilhéus de *Langerhans*** – enquanto que na DM1 a destruição deste tipo de células é causada por respostas auto-imunes, na DM2 esta ocorre devido à apoptose que é induzida por factores metabólicos, mediados por processos inflamatórios, como a hiperglicemia crónica, e por adipocitoquinas e ácidos gordos livres, sendo que estes, quando presentes em grandes quantidades, levam à disfunção mitocondrial e ao stress oxidativo, provocando a morte celular. Certos estudos indicam que humanos com historial de infecção por *Schistosoma* apresentam uma percentagem reduzida de triglicéridos, de HbA1c, de glicémia pós-prandial e uma maior capacidade de processar a glucose. Assim, a elevada produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e TGF- $\beta$ , provocada pelos Helmintas pode regular negativamente o processo inflamatório implicado na destruição das células  $\beta$  dos ilhéus de *Langerhans*;

Actualmente, existem já inúmeras evidências que demonstram que os Helmintas e/ou seus produtos, juntamente com o seu efeito imunomodulador, podem constituir alternativas terapêuticas para a DM1. No entanto, a influência destes no desenvolvimento de DM2 continua a ser alvo de investigação, havendo já bastantes estudos imunológicos e experimentais que indicam que estes reduzem a resistência à glucose em casos de obesidade induzida (Tahapary et al., 2015).

Um estudo levado a cabo por Wiria e colaboradores apurou que existe associação entre helmintoses provocadas por nematodes e um aumento de sensibilidade à insulina, sendo que estes destacaram também a relação entre os Helmintas e o metabolismo energético, pois os parasitas podem alterar processos como a digestão e/ou absorção de nutrientes (Wiria et al., 2015).

Outro estudo, ainda a decorrer e realizado por Tahapary e colaboradores, com recurso ao método SUGARSPIN, procura avaliar se a terapêutica anti-helmíntica em indivíduos previamente infectados está relacionado com um aumento de resistência à insulina. Para além da alteração do balanço energético devido ao consumo excessivo de alimentos altamente calóricos e/ou à redução de actividade física, hoje sabe-se que também a inflamação crónica, mesmo que residual, é uma das principais causas etiológicas da

DM2, devido à activação de processos inflamatórios por ácidos gordos livres em vários órgãos. Devido às propriedades anti-inflamatórias e reguladoras inerentes aos Helmintas e/ou aos seus produtos, a capacidade de estes alterarem o metabolismo energético através da diminuição da absorção de calorias e promoção de respostas imunitárias Th2 pode ser responsável pelo aumento na sensibilidade à insulina (Tahapary et al., 2015).

Como referido anteriormente, a possível utilização terapêutica dos Helmintas e/ou dos seus produtos está melhor documentada relativamente à DM1. Um estudo realizado em 2014 por Lund e seus colaboradores procurou analisar a possível inibição de Linfócitos T autoreactivos, e consequente prevenção do desenvolvimento de DM1, gerada pela administração de proteínas excretadas pelo helminta *Fasciola hepatica* em roedores diabéticos não-obesos.

As propriedades imunomoduladoras dos E/S da *F. hepatica* estão já bem descritas e incluem a capacidade de activar M2 reguladores, de prevenir a apresentação de antígenos por parte de CD e de inibir a multiplicação de Linfócitos Th1/Th17 pró-inflamatórios. Neste estudo, Lund e a sua equipa constataram que estas preveniram a destruição das células  $\beta$  do pâncreas ao inibir a resposta inflamatória, através da indução de um “ecossistema” imunoregulador constituído por linfócitos Bregs e M2, que estimula a multiplicação de linfócitos Tregs *Foxp3*<sup>+</sup> e a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ). Este estudo culminou na descoberta que os E/S da *F. hepatica* previnem o desenvolvimento da DM1 em roedores diabéticos não-obesos (Lund et al., 2014).

Por outro lado, em 2015, Amdare e seus colaboradores procuraram avaliar se os E/S produzidos pela filária *Brugia malayi* conseguem atenuar o desenvolvimento de DM1 induzida por Streptozotocina (STZ) em roedores. A STZ, quando administrada em baixas quantidades, estimula a migração de macrófagos, linfócitos e outras células mononucleares para os ilhéus de *Langerhans*, resultando na destruição de células  $\beta$  produtoras de insulina. Neste estudo, em que avaliaram o tratamento profilático do desenvolvimento de DM1 com recurso a antígenos *B. malayi*, constataram que após a indução de Diabetes, houve uma redução dos níveis de glicémia ao mesmo tempo que 57,5-62,5% dos roedores permaneceram não-diabéticos.

Noutra vertente do estudo, foi possível concluir que a administração dos mesmos antígenos em modelos que já tinham desenvolvido DM1 provocou a remissão da

doença, em 62,5-71,5% dos roedores. Amdare e seus colaboradores atribuíram este efeito à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  e com o aumento da produção de IL-10, sendo que também reportaram uma mudança na produção de anticorpos anti insulina, de um subtipo IgG2a para IgG1, concluindo assim que os produtos E/S excretados por Helmintas podem ser equacionados como novos agentes terapêuticos na cura/atenuação da DM1 (Amdare et al., 2015).

No entanto, em ambos os estudos supramencionados, nenhum procurou avaliar os possíveis efeitos terapêuticos em roedores que já apresentavam sintomas de insulite, isto é, de inflamação das células  $\beta$  do pâncreas. Um estudo levado a cabo por Ajendra e seus colaboradores, em 2016, com recurso a uma combinação entre pró-insulina intranasal e administrações de antígenos da filária *Litosomoides sigmodontis*, procurou avaliar a eficácia na prevenção e remissão de DM1 antecedida de insulite.

Esta investigação concluiu que a terapia combinada administrada preveniu o desenvolvimento de DM1, o que comprova a capacidade protectora dos antígenos helmínticos relativamente a doenças auto-imunes. Esta prevenção foi associada à indução de linfócitos Tregs nos nódulos linfáticos pancreáticos, que por sua vez suprimem as reacções imunitárias específicas a auto antígenos (Ajendra et al., 2016). Para além destes estudos, está também comprovado que infecção por *Schistosoma mansoni*, *Heligmosomoides polygyrus* e *Trichinella spiralis* inibe e/ou retarda o desenvolvimento de Diabetes em roedores diabéticos não obesos, reforçando a hipótese de que existe um uso terapêutico para os produtos excretados por Helmintas na Diabetes Mellitus. No entanto, são necessários mais estudos, principalmente ensaios clínicos, que demonstrem que é possível utilizar a terapia helmíntica na prática clínica da DM (Amdare et al., 2015).

## **4.2 Terapêutica helmíntica em Doenças Reumáticas**

As Doenças Reumáticas são um conjunto de doenças que atingem o sistema músculo-esquelético (músculos, ossos, articulações, tendões ou ligamentos), cujos sintomas mais comuns são a inflamação, a dor e a redução de movimentos. Apesar de as causas etiológicas e a fisiopatologia desta doença não estarem completamente compreendidas, hoje sabe-se que a maioria destas doenças estão relacionadas com auto-imunidade, pela produção de anticorpos activos contra auto-antígenos do organismo humano. Certos estudos suportam a hipótese de que factores genéticos, hormonais, farmacológicos e ambientais possam desempenhar um papel importante no desenvolvimento destas patologias (Niklas, Niklas, Majewski, & Puszczewicz, 2016).

Apesar de o Reumatismo incluir um leque muito alargado de patologias, será apenas abordada a influência que os Helmintas podem exercer relativamente a doenças como a Artrite Reumatóide (AR), a doença reumática mais comum, e o Lupus Eritematoso Sistémico (LES), pelo simples motivo de serem estas as únicas patologias utilizadas como base para estudar o possível efeito terapêutico destes parasitas.

A Artrite Reumatóide é uma doença auto-imune que afecta cerca de 1-2% da população mundial e que é caracterizada pela perda de tolerância imunológica relativamente a auto-antígenos. Devido a isto, ocorre infiltração de células inflamatórias na membrana sinovial das cartilagens que por sua vez leva à hiperplasia sinovial, juntamente com uma angiogénese progressiva que leva à concomitante destruição da cartilagem e do osso. A entrada de Linfócitos Th1 e Th17 nos tecidos articulares promove a libertação de citocinas e de quimiocinas pró-inflamatórias que induzem a migração e activação de macrófagos e neutrófilos, responsáveis pela perda do bom funcionamento da articulação (Carranza et al., 2012).

O potencial da utilização terapêutica dos Helmintas e/ou os seus produtos na AR parece residir na capacidade que estes têm de inibir respostas imunitárias mediadas por estes Linfócitos autoreactivos, associada à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, entre outras), ao mesmo tempo que estimulam a manutenção de respostas imunitárias Th2, mediadas por citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, entre outras) (Shor & Shoenfeld, 2013).

Apesar de haver cada vez mais evidência de que estes parasitas podem influenciar positivamente o nosso SI na prevenção e/ou tratamento da AR, os únicos trabalhos experimentais foram realizados em roedores onde a doença artrítica foi induzida com recurso a agentes etiológicos, em situações onde esta apresentava muitas semelhanças patológicas com a AR.

Um estudo levado a cabo por Song e a sua equipa, em 2011, procurou avaliar os efeitos da infecção de roedores, antes e depois de desenvolverem Artrite induzida por Colagénio (AIC), por parte do helminta *Schistosoma japonicum*. Estes concluíram que o “desvio” em direcção à predominância de respostas imunitárias Th2 coincide com a deposição dos ovos por parte dos parasitas, sendo que os ovos aparentam ser bastante mais imunogénicos do que os vermes adultos, na indução de respostas anti-inflamatórias. Para além disto, estes demonstraram ser capazes de regular sistematicamente o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias.

A infecção por *Schistosoma japonicum* demonstrou ser bastante eficaz na profilaxia e tratamento de AIC em roedores. Song e a sua equipa constataram, após análise serológica dos marcadores imunológicos da infecção, um aumento na população de linfócitos Tregs e uma diminuição da quantidade de Linfócitos Th1 e Th17, devido à capacidade que os primeiros têm de inibir a activação de Linfócitos T reactivos. Este processo está também associado ao aumento de produção de IL-10 por parte dos linfócitos Tregs e à diminuição da excreção de citocinas que medeiam o processo inflamatório, como é o caso do TNF- $\alpha$ , da IL-6 e da IL-1. Por outro lado, o efeito benéfico conferido pelo parasita também se manifestou ao restaurar as respostas imunitárias mediadas por Linfócitos T para os níveis homeostáticos em articulações inflamadas, ao prevenir a activação de osteoclastos e reduzir os danos na articulação, o que confere um efeito protector aos Helmintas no tratamento de AIC (Song et al., 2011).

Em 2012, Carranza e a sua equipa demonstraram que o papel desempenhado pelas CD na infecção helmíntica também beneficia o hospedeiro. As CD, em especial as CD tolerogénicas, são cruciais na activação de Linfócitos Th e na indução de tolerância a auto-antígenos devido à habilidade que estes têm de promover o desenvolvimento de linfócitos Tregs, de induzir a apoptose e de inibir o funcionamento de células efectoras autoreactivas, para além do facto de serem as CAA mais funcionais.



Carranza e seus colaboradores procuraram analisar o efeito de extracto bruto de *Fasciola hepatica*, em conjunto com diversos ligandos de TLR, na estimulação de CD e se esta contribui para a atenuação dos sintomas de AIC em roedores. Após análise dos resultados, constataram que o ligando do TLR9, CpG, em associação com o extracto bruto do parasita, provocou alterações nas CD que promoveram o aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e da expressão de moléculas e enzimas co-estimulatórias, ao mesmo tempo que moderaram a quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Estes mecanismos foram responsáveis pela atenuação de respostas Th1/Th17 e pela indução de tolerância a auto-antígenos mediada por linfócitos Tregs, que suprimiram a condição inflamatória num modelo idêntico a AR (Carranza et al., 2012).

Um estudo levado a cabo por Rodgers e seus colaboradores em 2014 procurou registar o efeito terapêutico da molécula ES-62, um antígeno E/S excretado pelo nematode *Acanthocheilonema viteae*, em modelos roedores com AIC, tendo concluído que o efeito protector desta molécula está relacionado com o aumento do número de linfócitos Bregs produtores de IL-10 que, por sua vez, suprimem o desenvolvimento de respostas imunitárias mediadas por Linfócitos Th1, Th17 e células  $\gamma\delta$ T produtoras de IL-17. Juntamente com a diminuição da proliferação de autoanticorpos patogénicos, específicos para o colagénio da cartilagem, e com a activação de CD, concluíram que a ES-62 inibe a infiltração de células inflamatórias na articulação, tendo protegido assim os roedores que padeciam deste modelo de AR, devido à regulação do equilíbrio entre Linfócitos B reactivos e reguladores (Rodgers et al., 2014).

Mais recentemente, em 2016, Eissa e a sua equipa de investigadores registaram os efeitos de antígenos autoclavados, provenientes dos Helmintas *Schistosoma mansoni* e *Trichinella spiralis* em roedores onde a doença artrítica lhes havia sido induzida. Este estudo demonstrou que, em termos terapêuticos, é preferível a utilização de antígenos e produtos à base de Helmintas em vez de uma infecção helmíntica deliberada, pois para além desta última ser de difícil compreensão para potenciais doentes (uma vez que não será fácil convencer um doente que, introduzir um ou mais parasitas no seu organismo, pode gerar um efeito terapêutico), também acarreta possíveis danos associados à migração dos parasitas e à fisiopatologia da infecção.

Eissa e seus colaboradores concluíram que ambos os antígenos foram eficazes na melhoria dos sintomas da doença artrítica nos roedores, sendo que ficou comprovado o efeito terapêutico que já era estipulado existir por parte do *S.mansoni*, ao mesmo tempo que a experiência trouxe novos desenvolvimentos relativamente ao potencial terapêutico da *T. spiralis*. Estes efeitos benéficos foram associados à diminuição da produção da citocina pró-inflamatória mais importante na imunopatologia da AR, a IL-17, pois especula-se que esta desencadeia a infiltração de células inflamatórias na articulação. Este mecanismo foi promovido pela indução e multiplicação de linfócitos Tregs, bem como pelo aumento da produção de IL-10 associada a estes. Para além disto, este estudo revelou uma curiosidade relacionada com o IFN- $\gamma$ , estipulando que este pode desempenhar um papel paradoxal em respostas imunitárias, devido à sua capacidade de regular negativamente a produção de IL-17 (Eissa et al., 2016).

Os estudos supramencionados dizem respeito a alguns dos contributos que trouxeram a confirmação de que os Helmintas e/ou os seus produtos podem ser utilizados como alternativa terapêutica, em doentes com AR. Relativamente ao LES, apesar de já haver algumas evidências que indicam que a terapêutica com recurso a Helmintas pode acarretar efeitos benéficos, o número de estudos que procurou avaliar tal relação é ainda bastante reduzido.

O Lupus Eritematoso Sistémico, ou LES, é uma doença reumática auto-imune, cuja etiologia ainda não é completamente compreendida, e que é caracterizada pela produção de autoanticorpos patogénicos, associada à danificação dos tecidos mediada por células do SI. Os estímulos que desencadeiam o processo inflamatório envolvido no LES parecem estar relacionados com a activação de Linfócitos B. Para além de serem responsáveis pela produção de anticorpos mediante a sua transformação em plasmócitos, os Linfócitos B funcionam como CAA ao fornecer sinais que conduzem a activação de Linfócitos T reactivos, sendo que a desregulação deste mecanismo pode conduzir a um “ciclo vicioso” de inflamação (Mota, Reddy, & Isenberg, 2016).

Apesar de a infecção por Helmintas também ser capaz de levar à produção e activação de autoanticorpos e Linfócitos T autoreactivos, estes induzem maioritariamente um estado de imunossupressão que lhes confere uma protecção em relação ao SI humano, permitindo-lhes permanecer mais tempo no hospedeiro. Zeller e a sua equipa de investigadores, em 2015, analisaram o caso clínico de um paciente com LES, em que este estava igualmente com uma intensa helmintose por *Taenia solium*, tendo concluído

que a mesma havia retardado o desenvolvimento de LES, devido aos seus mecanismos imunossupressores (Zeller et al., 2015).

Assim, é cada vez mais pertinente que haja uma investigação contínua para que os Helmintas e/ou os seus produtos sejam equacionados como alternativas terapêuticas, de baixo custo, para inúmeras patologias, entre as quais as doenças reumáticas.

### **4.3 Terapêutica helmíntica na Esclerose Múltipla**

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença auto-imune crónica da matéria branca do Sistema Nervoso Central (SNC) que, em 2013, afectava mais de dois milhões de indivíduos, mundialmente, sendo a causa mais comum de disfunção neurológica não traumática em jovens adultos que residem em países desenvolvidos. Apesar de a sua etiologia ser ainda desconhecida, é uma patologia caracterizada pelo excesso de respostas imunitárias inflamatórias mediadas por células do SI, sendo que a progressão da doença acaba por causar desmielinização dos neurónios, seguida de neuropatia periférica associada à perda dos axónios (Correale, 2014).

A sintomatologia da EM é progressiva e incapacitante. Os primeiros sintomas, normalmente, são surtos de disfunção neurológica tais como visão dupla, descoordenação, entorpecimento, fraqueza e perda de visão monocular. Estes períodos normalmente permanecem durante vários dias ou semanas, havendo depois uma recuperação total ou parcial, um padrão que é característico da Esclerose Múltipla Surto Remissão (EMSR). Após uma década de vários surtos e remissões, a doença pode evoluir em direcção a uma forma estável de incapacidade, sendo essa a condição que caracteriza a Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (EMSP). Por outro lado, alguns doentes apresentam uma forma da doença, a Esclerose Múltipla Primária Progressiva (EMPP), que está associada a uma rápida e implacável progressão dos sintomas desde o seu início (J. O. Fleming, 2013).

Os motivos que levam ao desenvolvimento de EM ainda não são claros, mas actualmente julga-se que a doença é despoletada devido a uma combinação entre uma acrescida susceptibilidade genética individual e factores ambientais externos. Hoje em dia sabe-se que a fisiopatologia da EM e da Encefalomielite Auto-imune Experimental (EAE), um modelo animal com várias semelhanças relativamente à EM, envolve o reconhecimento de antígenos da bainha de mielina por parte de Linfócitos Th1 e Th17 disfuncionais, entre outras células, que atacam a bainha de mielina e destroem as células produtoras de mielina, os oligodendrócitos. O equilíbrio entre estes Linfócitos é um factor crítico na fisiopatologia da doença, pois um elevado rácio entre Th17 e os Th1 está associado à infiltração de Linfócitos Th no SNC, com consequente inflamação da matéria branca. Para além destas células, estipula-se também que a perda de actividade

de linfócitos Tregs, com o aumento da actividade dos Linfócitos Tc associado e em conjunto com processos mediados por Linfócitos B e CAA, podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Correale & Farez, 2012).

Uma das primeiras hipóteses equacionadas acerca de um possível uso terapêutico para os Helmintas e/ou os seus produtos, no tratamento da EM, foi elaborada por Jorge Correale e Maurício Farez que, ao compararem pacientes de EMSR com infecções helmínticas gastrointestinais assintomáticas e pacientes de EMSR sem registo de helmintoses, depararam-se com resultados que apontavam para um melhor controlo da sintomatologia da EM no primeiro grupo, tendo atribuído isto à diminuição da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , ao aumento da expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  e à indução de linfócitos Bregs e Tregs (John O. Fleming, 2011).

Noutro estudo, que também envolvia as comparações acima descritas, *Correale e Farez* concluíram que as helmintoses funcionaram como uma espécie de “interruptor” imunológico: quando presentes, a sintomatologia da EM foi reduzida. Após as helmintoses serem tratadas com recurso a fármacos, a sintomatologia da EM aumentava. Estes também demonstraram que os pacientes que não estavam infectados por Helmintas apresentavam níveis superiores de IL-12 e de IFN- $\gamma$ , concomitantemente com níveis reduzidos de IL-10 e TGF- $\beta$ , quando comparados com os pacientes com helmintoses. Esta condição pró-inflamatória, característica de pacientes com EMSR, foi revertida após certos pacientes terem sido infectados por Helmintas. No entanto, após a eliminação dos mesmos, as citocinas excretadas voltaram a apresentar um padrão pró-inflamatório (Vitale, Gaetano; Mion, 2014).

O interesse neste tipo de estudos acerca de um possível uso terapêutico para os Helmintas na EM surgiu após terem sido realizadas experiências em animais, com vista a avaliar os efeitos de helmintoses pré-estabelecidas ou induzidas com o objectivo de tratar ou prevenir o desenvolvimento de EAE. Nesta perspectiva, ficou demonstrado que a utilização de *Schistosoma mansoni* e/ou dos seus ovos está associada à atenuação da condição clínica, à redução de incidência e ao atraso do desenvolvimento de EAE em roedores, devido à redução dos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , coincidente com o aumento da produção de IL-10 e TGF- $\beta$ . Para além deste helminta, também a *Fasciola hepatica* e a *Taenia crassiceps* demonstraram ser capazes de regular negativamente a resposta imunitária relativamente a auto antigénios envolvida nas doenças auto-imunes ao suprimirem a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ , ao mesmo tempo que estimularam a

produção de IL-10 e IL-4 e limitaram a infiltração leucocitária no cérebro e na espinal medula (Correale & Farez, 2012).

Este efeito benéfico que os Helminthas aparentam possuir sobre o nosso SI na prevenção de doenças auto-imunes parece estar relacionado com a activação de TLR, em particular dos TLR2 que, para além de aumentar a expressão deste tipo de receptores nas células do SI, contribui ainda para o aumento de Células Sanguíneas Periféricas (CSP) produtoras de IL-10 e de TGF- $\beta$ , para a diminuição de CSP produtoras de IL-12 e IFN- $\gamma$ , ao mesmo tempo que aumenta a frequência de clonagem de linfócitos Tregs e Bregs (J. O. Fleming, 2013).

Já foram iniciados diversos ensaios clínicos relativamente a terapias helmínticas na EM, tendo sido utilizados, na sua maioria, os helmintas *Trichuris suis* e *Necator americanus*. No entanto, devido à longa duração destes, muitos dos resultados não estão ainda disponíveis. Em 2013, Rosche e a sua equipa de investigadores, motivados pelos resultados supramencionados, procuraram avaliar os efeitos e a eficácia de um ensaio clínico de fase II com recurso a ovos de *Trichuris suis* em pacientes com EMSR, analisando posteriormente o balanço entre Linfócitos Th1/Th2/Th17 e a concentração de citocinas, para além da quantificação das subpopulações de Linfócitos Th e Linfócitos Tc, CLIs, linfócitos Bregs e Tregs (Rosche, Wernecke, Ohlraun, Dörr, & Paul, 2013).

Até à data, os resultados deste estudo ainda não estavam disponíveis. No entanto, Fleming e seus colaboradores realizaram um estudo semelhante, sendo a duração de 3 meses em vez dos 12 meses de longevidade do estudo da equipa de Rosche, onde houve uma recessão sintomática e clínica da doença. Apesar disto, após o tratamento, a doença voltou a agravar-se, sugerindo que talvez seja necessária uma terapia permanente com vista a atingir a completa remissão de doenças crónicas como a EM (Rosche et al., 2013).

Em 2012, Benzel e os seus colaboradores da Universidade Charite, em Berlim, conduziram um estudo pioneiro sobre terapêutica helmíntica em pacientes com EMSP, em que estes foram infectados com ovos de *Trichuris suis*, com vista a averiguar se estes limitam a intensidade das respostas imunitárias Th1 e/ou potenciam uma resposta Th2 generalizada, com os respectivos efeitos anti-inflamatórios associados. A análise imunológica posterior dos pacientes em estudo demonstrou uma redução acentuada do

padrão de citocinas inflamatórias associadas a respostas Th1 (especialmente de IL-2 e IFN- $\gamma$ ), um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias Th2, como a IL-4, e ainda uma eosinofilia moderada acompanhada por alterações nos Linfócitos Th e Linfócitos Tc (Tanasescu & Constantinescu, 2014).

Já em 2014, foi realizado um estudo no Centro de EM dinamarquês de Copenhaga por uma equipa de investigadores liderados por Voldsgaard, em que pacientes com EMSR foram tratados com recurso a ovos de *Trichuris suis*, com o objectivo de avaliar os mesmos parâmetros supramencionados. Voldsgaard e a sua equipa concluíram que, à semelhança dos outros estudos, a terapia administrada demonstrou ser segura e bem tolerada, sem nenhuns efeitos adversos significativos para além de alguns sintomas gastrointestinais. No entanto, a análise dos dados clínicos e imunológicos não permitiu tirar ilações que constituíssem prova de um efeito benéfico exercido pelos Helmintas na fisiopatologia da EM (Voldsgaard et al., 2014).

Foi na Universidade de Nottingham, no Reino Unido, que foi iniciado o último ensaio clínico de fase II, em que 72 pacientes com EMSR e EMSP foram propositadamente infectados com *Necator americanus*, tendo os parasitas permanecido no hospedeiro durante 9 meses. Segundo os investigadores, seria esse o período de tempo necessário para o organismo estabelecer e manter os mecanismos imunoreguladores capazes de desencadear uma resposta anti-inflamatória e, consequentemente, um efeito terapêutico. Para além dos parâmetros imunológicos já referidos, os investigadores pretendiam também analisar o aparecimento de novas lesões cerebrais decorrentes da EM nos pacientes estudados (Tanasescu & Constantinescu, 2014).

A utilização de Helmintas e/ou dos seus produtos para o tratamento da EM pode levantar algumas questões de segurança, mas nenhum dos ensaios clínicos até hoje realizados ofereceram suporte a esta teoria. As helmintoses podem acarretar riscos adicionais, como por exemplo a intensificação da resposta inflamatória subjacente a uma infecção bacteriana resultante da exposição a uma bactéria entérica patogénica, isto durante a primeira fase da colonização helmíntica. Para além disso, já foi demonstrado que os Helmintas podem suprimir ou modificar a resposta imunitária relativamente a antígenos não-parasitários, aumentando a predisposição de alguns pacientes a infecções bacterianas, protozoárias ou virais (Correale, 2014).

No entanto, estes riscos são bastante semelhantes com os riscos das mais modernas terapias (agentes imunossupressores/imunomoduladores, inibidores de citocinas e corticosteroides) para a EM, que podem promover ou agravar as infecções supramencionadas, para além dos efeitos adversos que a elas estão associados. Caso seja demonstrado clinicamente que a terapia helmíntica é eficaz ao induzir processos imunoreguladores capazes de limitar a actividade patológica, esta pode constituir uma nova abordagem relativamente ao tratamento da EM, com pouco risco de efeitos secundários relativamente às actuais terapêuticas (Tanasescu & Constantinescu, 2014).



#### **4.4 Terapêutica helmíntica na Doença Alérgica**

A Doença Alérgica, que se pode manifestar na forma de rinite alérgica, Asma, alergias alimentares, eczema, conjuntivite alérgica e anafilaxia, é uma patologia inflamatória que é causada por respostas específicas a alérgenos por parte de Linfócitos Th2. Estes induzem a proliferação de eosinófilos com consequente eosinofilia e a contracção do músculo liso das vias respiratórias, assim como a produção de muco e de IgE específica para os alérgenos que, ao ligar-se a receptores presentes em mastócitos, basófilos e eosinófilos, vai promover a desgranulação destes após uma relação cruzada entre as células, a IgE e os alérgenos (Erb, 2009).

Vários estudos epidemiológicos de diferentes zonas do mundo demonstraram que a prevalência de doenças do foro alérgico ou atópico têm vindo a aumentar exponencialmente nas últimas décadas, sendo que actualmente já atingiram proporções epidémicas, pelo que é praticamente impossível quantificar o número de pessoas afectadas e que tenham tido, pelo menos um “episódio” alérgico. Esta tendência foi comprovada, por exemplo, num estudo efectuado na Gronelândia, onde a frequência de atopia (sendo esta uma predisposição para a ocorrência de reacções alérgicas) foi avaliada com recurso à quantificação de IgE específica para os alérgenos mais comuns, sendo que os seus níveis dobraram entre 1987 e 1988. Este aumento têm sido particularmente constatado nos países ocidentais industrializados e em zonas urbanas dos países em desenvolvimento, onde aproximadamente 15-30% da população é afectada (Schabussova & Wiedermann, 2014).

As helmintoses e a doença alérgica possuem muitos parâmetros em comum pois ambas desencadeiam respostas imunitárias por parte de Linfócitos Th2, que se coadunam com a expressão de elevados níveis de IgE e de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, eosinofilia e desgranulação dos mastócitos (Daniłowicz-Luebert, O'Regan, Steinfeld, & Hartmann, 2011).

De facto, foram observadas diversas semelhanças estruturais e imunológicas entre vários alérgenos e os antígenos parasitários. Assim, teoricamente, os Helmintas deveriam exacerbar as respostas envolvidas na doença alérgica em vez de poder exercer algum efeito terapêutico sobre as mesmas (Rottem, Geller-Bernstein, & Shoenfeld, 2015).

Sendo assim, como é possível que estes parasitas possam exercer um efeito atenuante sobre a doença alérgica? Numa revisão levada a cabo por Fallon e Mangan, estes sugeriram que os possíveis efeitos antialérgicos causados pelos Helmintas estão relacionados com a natureza das respostas imunitárias Th2 despoletadas pelos mesmos. Nesse estudo, catalogaram as respostas Th2 em “alérgicas” ou “modificadas”, associando este último tipo à resposta imunitária induzida pelos Helmintas, caracterizada pela predominância de linfócitos Tregs e IL-10 e pela reduzida actividade da citocina IL-5 (Osada & Kanazawa, 2010).

As respostas imunitárias do tipo Th2 estão envolvidas principalmente em três processos: inflamação, cicatrização e resistência aos Helmintas. Estes, por sua vez, desenvolveram várias estratégias eficazes para modular e suprimir as respostas Th2 protectoras do hospedeiro, sendo que uma destas estratégias consiste na secreção de uma vasta gama de moléculas imunomoduladoras, capazes de influenciar várias células do hospedeiro e, ao alterá-las, de induzir uma resposta imunitária “modificada”. Esta resposta serve para os Helmintas limitarem a possibilidade de uma resposta imunitária Th2 prejudicial, prevenindo assim os graves sintomas muitas vezes observados em alergias (Ebner et al., 2014).

Inicialmente, pensava-se que esta resposta “modificada” induzida pelos Helmintas consistia no desenvolvimento de determinados isótopos de anticorpos, como por exemplo a produção de IgG4 acompanhada por um decréscimo de IgE, assim como das citocinas IL-4 e IL-5. Concomitantemente, os Helmintas aumentam também os níveis de IL-10, que resultam da indução de vários tipos de células reguladoras (Daniłowicz-Luebert et al., 2011).

No entanto, recentemente, surgiu uma teoria que apontou outro mecanismo como responsável pela atenuação dos sintomas alérgicos verificada em helmintoses. Esta teoria, denominada de “saturação de IgE”, defende que a prevenção de reacções de hipersensibilidade relativamente a vários alérgénios está relacionada com a capacidade dos Helmintas de estimularem a produção de grandes quantidades de IgE policlonal, o que por sua vez poderá saturar os receptores Fc presentes na superfície dos basófilos, mastócitos e eosinófilos, bloqueando-os e prevenindo assim a sua desgranulação (Schabussova & Wiedermann, 2014).

Em várias helmintoses, a IgE está envolvida na protecção do hospedeiro contra o parasita, o que está de acordo com a hipótese supramencionada de que uma infecção parasítica compete pela resposta IgE – Linfócito Th2 – Eosinófilo. Assim, a colonização helmíntica previne a inflamação das vias aéreas associada à doença alérgica, ao inibir a eosinofilia induzida por alérgenos e a produção de citocinas Th2 específicas para alérgenos. Para além disto, os Helmintas podem ainda promover a manutenção de elevados níveis de citocinas reguladoras, capazes de desregular a resposta alérgica (Rottem et al., 2015).

Adicionalmente, está ainda estabelecido que os MAA podem desempenhar um papel importante ao nível da protecção conferida pelos Helmintas relativamente à doença alérgica pois estes contribuem para a supressão das funções dos Linfócitos T reactivos, impedindo assim o desenvolvimento da resposta alérgica (Osada & Kanazawa, 2010).

A possível utilização terapêutica dos Helmintas e/ou dos seus produtos na doença alérgica está ainda a ser considerada devido à escassez de dados e à prematuridade das descobertas mais recentes. Numerosos estudos realizados em roedores demonstraram que a infecção por *Strongyloides stercoralis*, *Litomosoides sigmodontis*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis* e larvas de *Schistosoma mansoni* reduziram as respostas alérgicas. No entanto, alguns estudos também comprovaram que os Helmintas também podem induzir ou exacerbar as mesmas, sendo que estes avaliavam a utilização das espécies *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* e *Brugia malayi*. Em suma, parece que os Helmintas possuem componentes tanto alérgenos como imunomoduladores no seu organismo, pelo que o balanço entre estes pode definir o resultado da sua utilização (isto é, a melhoria ou agravamento) na doença alérgica (Erb, 2009).

Como já foi referido, a aplicação terapêutica de Helmintas vivos já há muito tempo que é considerada, pelo que já se realizaram diversos ensaios clínicos nas mais variadas doenças, enquanto outros continuam a ser realizados. No entanto, existe um grande interesse na identificação, caracterização e produção de moléculas terapêuticas à base de produtos excretados por estes parasitas, devido ao facto de estes permitirem evitar a fisiopatologia associada a uma helmintose que pode, por vezes, gerar efeitos adversos para o hospedeiro. Estes produtos induzem um microambiente benéfico para o parasita, ao mesmo tempo que previne patologias relacionadas com respostas Th2 exageradas,

pelo que podem ser especialmente úteis na prevenção e/ou tratamento da doença alérgica (Schabussova & Wiedermann, 2014).

Neste sentido, Daniłowicz-Luebert e a sua equipa de investigadores procuraram identificar quais as moléculas excretadas por Helmintas que têm mais potencial terapêutico na doença alérgica, tendo concluído que este leque é constituído pelos Inibidores da Protease (Cistatinas), moléculas de *Ascaris suum*, homólogos de citocinas e quimiocinas humanas, antigénios derivados de *Schistosoma* e a ES-62. Estes produtos excretados pelos parasitas têm a capacidade de influenciar o desenvolvimento da doença devido, maioritariamente, mas não exclusivamente, à produção de IL-10 e TGF- $\beta$  e à activação de várias células com função reguladora e atenuante (Daniłowicz-Luebert et al., 2011).

Um estudo efectuado em 2014, por Ebner e seus colaboradores, procurou avaliar a eficácia de uma terapia à base de produtos E/S provenientes do helminta *Trichuris suis* em roedores com doença alérgica das vias aéreas. Estes concluíram que as proteínas excretadas pelo referido parasita possuem um potente efeito imunomodulador, quer em modelos *in vitro* e *in vivo*. Concretamente, os E/S de *T.suis* influenciaram a activação de CAA e reduziram a produção de citocinas por parte de Linfócitos Th específicos para antigénios.

Simultaneamente, a administração dos produtos E/S durante a fase de sensibilização a um alérgénio resultou na atenuação de respostas mediadas por Linfócitos Th2 e por anticorpos específicos para os alérgénios (IgE), assim como de respostas imunes inatas decorrentes da produção de IL-5 e IL-13, tais como a eosinofilia e hiperplasia das células produtoras de muco. Estes dados indicam que existe, de facto, um potencial imunomodulador exibido pelos produtos excretados por *T.suis*, que exerceram um efeito supressor na doença alérgica presente em roedores (Ebner et al., 2014).

Outro estudo, levado a cabo por Campolina e a sua equipa de investigadores em 2015, pretendia entender a relação entre a prevalência e intensidade de infecções por parte de *S.mansoni* e Ancilóstomos em populações endémicas e a predominância de respostas IgE dirigidas ao antigénio de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1), um dos ácaros mais susceptíveis de despoletar reacções alérgicas, antes e após o tratamento das helmintoses. Após a análise de resultados, estes descobriram que os níveis de IgE anti-

Der p1 tinham aumentado após o tratamento, provavelmente devido ao aumento dos níveis de IL-4 e IL-5 e a uma redução significativa nos níveis de IL-10.

Para além disto, Campolina e a sua equipa repararam que, após o tratamento, os indivíduos que apresentavam uma infecção mais intensa possuíam níveis mais elevados de IgE anti-Der p1, o oposto do que se verificava em indivíduos com infecções de baixa intensidade, tendo concluído que o tratamento eficaz dos sujeitos de áreas endémicas com uma elevada prevalência de infecção potencia o aumento dos níveis desta imunoglobulina, que constitui por si só um factor de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas (Campolina et al., 2015).

Actualmente estão a decorrer ainda vários estudos e ensaios clínicos com vista à utilização terapêutica dos Helmintas e/ou dos seus produtos na patologia alérgica, pelo que os resultados e conclusões futuras podem trazer várias mais-valias para a pesquisa e desenvolvimento de terapias que permitam atenuar ou mesmo curar esta doença que têm uma elevada incidência nos países desenvolvidos.

#### **4.4.1 Asma**

A Asma é uma doença complexa com elevada morbilidade e mortalidade que é caracterizada por sintomas como a inflamação das vias aéreas, hipersecreção de muco, episódios recorrentes de obstrução das vias aéreas e pieira. As estimativas mundiais apontam para que cerca de 300 milhões de pessoas sofram de Asma, sendo que os números continuam a aumentar. Existem vários tipos de Asma, sendo estes a Asma alérgica, a Asma não-alérgica e a Asma Intrínseca, sendo que em alguns indivíduos é possível verificar que estas três formas existem em conjunto (Zakeri, Borji, & Haghparast, 2016). No entanto, nesta monografia, apenas será abordada uma possível utilização terapêutica dos Helmintas na Asma alérgica devido ao facto de ter incluído esta patologia na temática da doença alérgica.

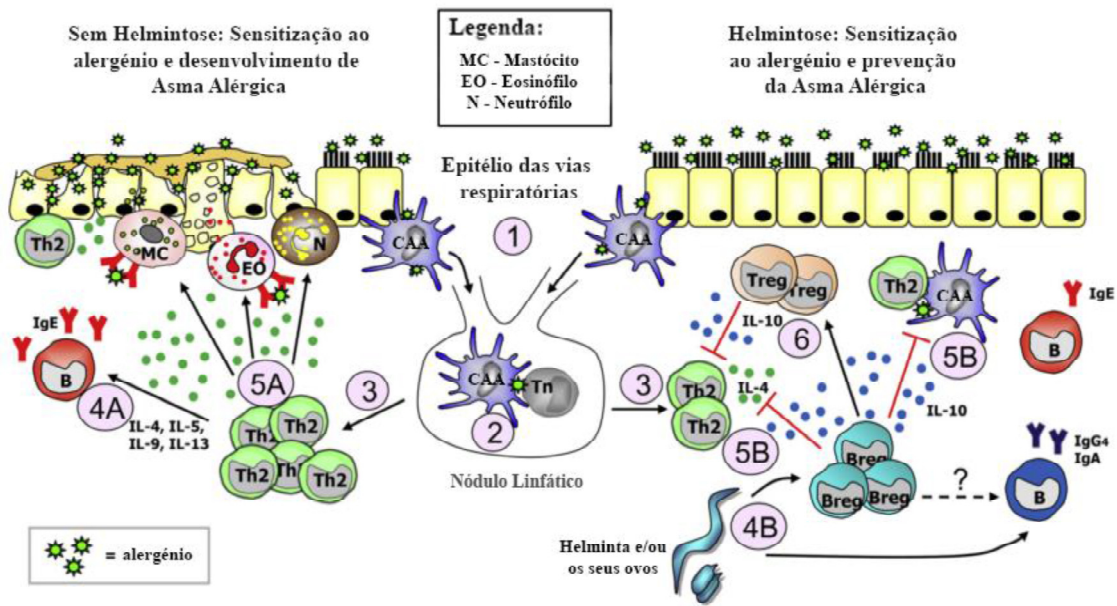
A Asma alérgica é a forma de Asma mais comum e é muitas vezes identificada pela presença de eosinófilos na expectoração e no lavado broncoalveolar do afectado. Os alérgénios presentes no ambiente do doente, tais como, por exemplo, os ácaros do pó da casa, os pelos dos animais, os bolores e o pólen das plantas desempenham um papel crucial na quebra de tolerância pulmonar, desencadeando uma resposta Th2 (Amu et al., 2010).

Em doentes asmáticos, é costume haver um comprometimento da integridade das células epiteliais, o que facilita a passagem de alérgenos através desta primeira barreira, permitindo-lhes atingir a submucosa das vias aéreas. Na submucosa, os alérgenos entram em contacto com as CD que são responsáveis por “apresentar” os alérgenos aos Linfócitos Th2. De seguida, os Linfócitos Th2 específicos para alérgenos, em conjunto com outras células atraídas para a zona, segregam citocinas do tipo Th2 tais como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. A IL-4 e IL-13 são mediadores cruciais na alteração verificada nos Linfócitos B, de modo a que estes modifiquem a classe de anticorpos produzida para IgE, enquanto que a IL-5 assume um papel decisivo na indução de eosinofilia, um apanágio da Asma (Zakeri et al., 2016).

Por sua vez, os eosinófilos libertam mediadores inflamatórios, incluindo IL-4 e IL-13, e eicosanóides lipídicos, tais como prostaglandinas, lipoxinas e leucotrienos, que são responsáveis pelos sintomas clínicos da Asma. Estas moléculas promovem as condições fisiopatológicas que caracterizam a Asma, através da indução de ciclos repetitivos de danos tecidulares e inflamação crónica, mesmo em meios onde haja ausência de alérgenos (Januskevicius et al., 2017).

Actualmente, já foi demonstrado que a maioria das terapias existentes para a Asma ou para outro tipo de doença alérgica, sendo elas a imunoterapia específica para alérgenos e os glucocorticoides, são capazes de induzir linfócitos Tregs produtores de IL-10, contribuindo desse modo para a redução da inflamação. Apesar disto, estas terapias visam tratar apenas os sintomas, pelo que é necessária uma aplicação vitalícia. Como tal, é necessário encontrar uma maneira de induzir uma “fonte” duradora de células produtoras de IL-10 em doentes asmáticos (Hussaarts, Van Der Vlugt, Yazdanbakhsh, & Smits, 2011).

Neste aspecto, as terapêuticas com recurso a Helminthas e/ou aos seus produtos podem representar uma alternativa viável e eficaz, uma vez que uma das particularidades das helmintoses é a indução de um determinado tipo celular, os linfócitos Bregs, que são células com uma grande actividade reguladora e anti-inflamatória, devido à produção de IL-10 e à activação de linfócitos Tregs (Kessel et al., 2012). A figura seguinte (Figura 7) ilustra o mecanismo de acção através do qual os Helminthas previnem a inflamação das vias aéreas e o desenvolvimento da Asma alérgica.



**Figura 7** - Efeito dos Bregs induzidos pelos Helmintas na prevenção da Asma alérgica – adaptada de (Hussaarts, Van Der Vlugt, Yazdanbakhsh, & Smits, 2011)

Através da análise da figura, podemos entender o processo pelo qual esta prevenção acontece. Em indivíduos não-infectados, o contacto com os alérgenos vai activar as CD presentes nas vias aéreas, que se vão acoplar a estes apresentando-os de seguida aos Linfócitos Th2, activando-os. Estes Linfócitos Th2 vão, conseqüentemente, activar a “cascata” alérgica nos pulmões, com a produção de IgE, de interleucinas do tipo Th2 e com o recrutamento de vários tipos celulares que produzem mediadores inflamatórios (1-4A/5A). Nos indivíduos infectados por Helmintas, o processo inicial é semelhante. No entanto, ao mesmo tempo, os antígenos parasíticos vão induzir linfócitos Bregs, que por sua vez vão produzir grandes quantidades de IL-10, inibir o funcionamento das CD e dos Linfócitos Th2 e activar os linfócitos Tregs, mecanismos responsáveis pela prevenção da Asma alérgica (Hussaarts et al., 2011).

Para além disto, a indução de linfócitos Bregs parece ainda promover alterações nos Linfócitos B que os levam a modificar a classe de anticorpos produzida (de IgE para IgA/IgG4), sendo este um dos mecanismos de defesa que os Helmintas possuem para evitar/redireccionar a resposta imunitária do organismo humano, prevenindo assim a sua eliminação (Sima et al., 2016)

Motivado por estudos epidemiológicos que indicam uma correlação inversa entre a prevalência de helmintoses e a incidência de doenças como a Asma, a Alergias, Diabetes e patologias auto-imunes, Kevin Mortimer e a sua equipa de investigadores

foram dos primeiros a propor uma possível utilização terapêutica do ancilóstomo *Necator americanus* na Asma alérgica. Em 2006, realizaram um estudo com recurso a este helminta em que avaliaram qual a quantidade de larvas necessária para obter amostras de 50 ovos por grama de fezes, uma vez que foi esta quantia, em estudos epidemiológicos, que estava associada a uma redução do risco de pieira. Para além de quantitativo, este estudo foi também qualitativo, uma vez que foram administradas diferentes doses de larvas (10, 25, 50 e 100), sendo que em todas as doses, excepto na de 10 larvas, se verificaram efeitos adversos que implicaram a retirada de alguns pacientes do estudo (Mortimer et al., 2006).

Para além disto, um ensaio clínico realizado pelos mesmos com recurso ao mesmo helminta, que procurava avaliar os efeitos da helmintose na redução dos sintomas de Asma, demonstrou que a infecção por *Necator americanus* não provocou uma melhoria do estado clínico da doença (Evans & Mitre, 2015).

Alguns anos mais tarde, em 2012, Bourke e seus colaboradores procuraram verificar se a infecção com recurso a ovos de *Trichuris suis* poderia ajudar a melhorar a situação clínica de pacientes com rinite alérgica, uma doença que evolui muitas vezes para Asma alérgica. Estes pacientes, recrutados com base nos sintomas de rinite verificados nas 2 épocas de pólen anteriores, possuíam IgE específica para relva e acusaram positivo para pólen da relva em testes de reactividade cutânea.

O objectivo era avaliar se a infecção por *Trichuris suis* se traduzia numa diminuição dos níveis de IgE específica para os alérgenos supramencionados, numa diminuição da intensidade dos sintomas e numa diminuição dos níveis de histamina. Após o término do estudo, os autores concluíram que nenhuma das variáveis avaliadas sofreu alterações, pelo que a helmintose propositadamente induzida não conferiu efeitos benéficos/protectores em pacientes com rinite alérgica (Bourke et al., 2012).

Apesar de os dois estudos com recurso a pacientes humanos não terem trazido boas perspectivas no que toca à utilização de Helmintas para tratar, ou pelo menos atenuar os sintomas da Asma alérgica, os estudos com recursos a modelos animais deixaram boas indicações acerca de uma possível utilização terapêutica destes parasitas.

Foram várias as experiências que descreveram efeitos benéficos de terapias com recurso a Helmintas e/ou os seus produtos em roedores com Asma. Por exemplo, a administração de extracto de *Ascaris* resultou numa inibição da produção de IL-5 e da



inflamação eosinofílica enquanto que a Filariase por *Litomosoides sigmodontis* demonstrou ser capaz de suprimir a hiperreactividade brônquica e eosinofilia pulmonar. Concomitantemente, a utilização de ES-62, produto excretado pela filária *A. vitae*, demonstrou um efeito positivo na inibição da libertação de mediadores inflamatórios por parte dos mastócitos (Osada & Kanazawa, 2010).

Sima e seus colaboradores, em 2016, realizaram um estudo em que utilizaram produtos E/S obtidos a partir do nematode *Marshallagia marshalli*, um helminta que habita em espécies dos gados caprino e ovino, avaliando a sua eficácia na supressão da inflamação das vias aéreas em roedores. No término do estudo, concluíram que os produtos da *M. marshalli* foram capazes de anular a inflamação das vias aéreas, condição precedente à Asma, tendo verificado ainda uma redução na infiltração de células inflamatórias no muco bronquial e uma diminuição na prevalência de lesões epiteliais e na hiperplasia de células caliciformes (Sima et al., 2016).

Sendo assim, porque motivo os resultados obtidos em modelos animais experimentais não demonstraram validade aquando da sua transportação para a prática clínica? Evans e Mitre publicaram um artigo em que se debruçaram sobre as conclusões dos trabalhos supramencionados, destacando 8 motivos pelo qual os ensaios clínicos com recurso a Helminthas não foram bem sucedidos e, consequentemente, não motivaram a existência de mais estudos (Evans & Mitre, 2015) :

1. A duração da infecção aparenta ser especialmente importante;
2. Os Helminthas podem não ter capacidade para proteger contra todo o tipo de doenças alérgicas;
3. Variações genéticas no hospedeiro podem influenciar os efeitos terapêuticos da helmintose;
4. O potencial terapêutico preventivo de cada espécie varia de espécie para espécie;
5. Podem ser necessárias infecções de grande intensidade para otimizar o efeito terapêutico;
6. Ainda está por definir se os Helminthas são tão eficazes em tratar a doença alérgica como a são a prevenir;
7. Uso de medicação concomitante pode impedir os Helminthas de exercer o seu efeito terapêutico;
8. Localização da infecção pode ser determinante em casos onde os parasitas não exercem efeitos sistémicos.

Apesar de ainda haver várias matérias que não foram abordadas na totalidade, parece que a utilização terapêutica de Helminthas e/ou dos seus produtos na Asma e em outras doenças alérgicas poderá obter mais sucesso na profilaxia do que no tratamento, caso seja possível prever quais os indivíduos mais susceptíveis de vir a desenvolver este tipo de patologias. No entanto, o objectivo principal da utilização de terapias à base de Helminthas é o tratamento, e apesar dos resultados negativos obtidos até à data em ensaios clínicos, dados prometedores foram obtidos em estudos experimentais com recurso a roedores, pelo que uma melhor investigação dos mecanismos que conferem protecção relativamente às doenças supramencionadas poderá trazer desenvolvimentos importantes que o permitam atingir (Evans & Mitre, 2015).

## **4.5 Terapêutica helmíntica nas Doenças Inflamatórias Intestinais**

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) constituem um grupo heterogéneo de doenças auto-imunes crónicas inflamatórias e idiopáticas, caracterizadas por várias alterações genóticas que conduzem a uma resposta imunitária agressiva, mediada por Linfócitos Th, direccionada a antígenos de bactérias pertencentes à flora intestinal (Szkudlowski et al., 2014).

Normalmente costuma-se desenvolver no início da idade adulta e assumem padrões do tipo remittente-recorrente. A patogénese das DII ainda não está completamente compreendida, mas sabe-se que o conjunto de variáveis genéticas, ambientais, étnicas e imunológicas pode ditar o aparecimento da doença. No entanto, as causas absolutas das doenças continuam por descobrir, sabendo-se apenas que as DII se manifestam através da perda de tolerância imunitária a bactérias da flora entérica, havendo posteriormente um desequilíbrio entre as bactérias patogénicas e comensais que danifica a mucosa intestinal e estimula a resposta imune (Niloofar et al., 2014).

A prevalência mundial das DII assume um rácio de 396/100,000 pessoas sendo que estes números se encontram em clara expansão, demonstrado pelo facto de haver um aumento de 10 pacientes afectados por ano (Hasby, Hasby Saad, Shohieb, & El Noby, 2015). Devido à inflamação da mucosa intestinal, a doença pode apresentar um vasto leque de sintomas, como por exemplo dor abdominal, diarreia intensa e contínua, hematoquesia, malnutrição e fadiga. Para além disto, pacientes com DII apresentam um risco elevado de vir a desenvolver cancro colorrectal, uma vez que se acredita que a inflamação crónica promove a carcinogénese (Sun et al., 2011).

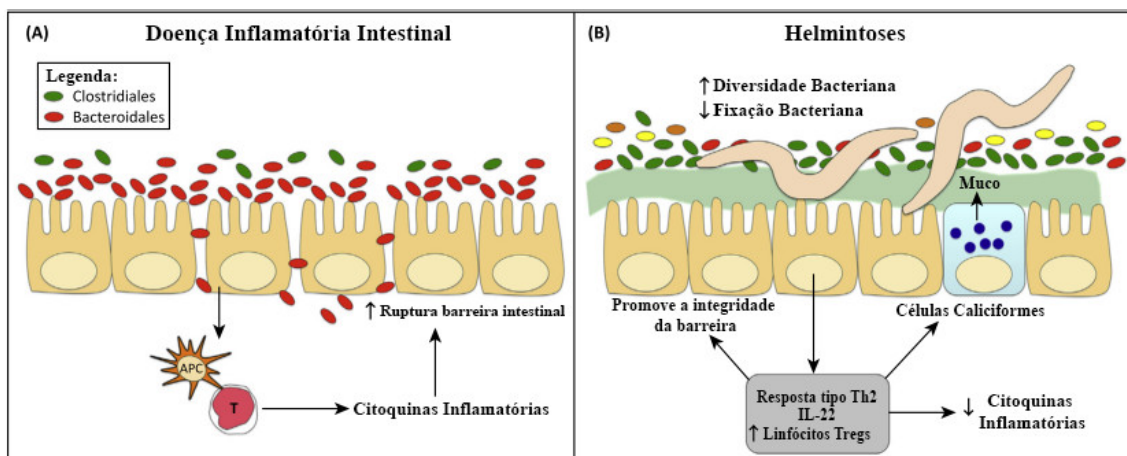
Existem dois tipos de DII: Colite Ulcerosa (CU) e Doença de Crohn (DC), diferenciadas pela localização e duração da inflamação. A CU é causada por um processo inflamatório, difuso e inespecífico, na mucosa intestinal e rectal que pode, ocasionalmente, levar à formação de úlceras enquanto que a DC consiste numa inflamação transmural, marcadamente granulomatosa, podendo afectar qualquer zona do TG (Tracto Gastrointestinal). No último tipo de DII, o processo inflamatório inicia-se na mucosa, à semelhança do que ocorre na CU, evoluindo gradualmente para todas as camadas da parede intestinal, causando fibrose e consequente destruição desta e resultando na presença de fístulas e estenose intestinal (Szkudlowski et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, o mau funcionamento do SI em pacientes com DII, com a respectiva perda de tolerância imunitária, leva à indução de inflamação local na mucosa pela flora intestinal, levando ao extravasamento e desintegração da barreira intestinal. As bactérias (patogénicas ou comensais) activam os “sistemas de detecção microbianos” que por sua vez iniciam respostas pró-inflamatórias através de células inatas, tais como os macrófagos e as CD, ao produzir as citocinas IL-12/IL-23, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Niloofar et al., 2014).

Este processo vai levar a uma intensa produção de citocinas inflamatórias (IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), contribuindo assim para a inflamação crónica que se verifica em pacientes com DII. Podemos assim ultimar que a predominância das citocinas inflamatórias em relação às que lhe são antagónicas é o “motor” fisiopatológico das DII. Estas são produzidas pelos linfócitos Th1 e Th17, tanto na DC como na CU, assim como pelos monócitos e granulócitos, que são recrutados para o local da inflamação (Ruyssers et al., 2008).

É importante referir que existem dois tipos de células que, nestas patologias em concreto, assumem especial relevância: as CD que, em fases iniciais da sua maturação, mantêm uma tolerância imunitária moderada relativamente a antígenos presentes no intestino, enquanto que as CD completamente desenvolvidas têm mais capacidade para “apresentar” antígenos e iniciar a resposta imunitária; e os linfócitos Th17, produtores de IL-17, que possuem um “perfil” marcadamente inflamatório, pois induzem a produção local de quimiocinas, citocinas e prostaglandinas (Szkudlowski et al., 2014).

Os Helmintas, ao promoverem uma resposta imunitária do tipo Th2, podem assim exercer um efeito terapêutico sobre ambas as DII, que são caracterizadas por uma predominância das respostas tipo Th1. Na figura 8, é possível observar os mecanismos pelos quais os Helmintas conferem protecção relativamente a este tipo de patologias.



**Figura 8** - Protecção conferida pelos Helmintas nas DII – adaptada de (Giacomin, Agha, & Loukas, 2016)

As DII estão associadas a uma diversidade microbiana limitada e à ruptura do epitélio intestinal, devido à incapacidade de produção de muco e quebra de adesão entre as células da mucosa. Consequentemente, bactérias do género *Bacteroidales* que habitam no intestino podem-se fixar-se ao epitélio e ultrapassar a barreira intestinal. Por sua vez, as CAA, vão acoplar-se a estas bactérias e vão “apresentá-las” a Linfócitos Th, que produzem citocinas inflamatórias para prevenir a disseminação bacteriana, mas que não restauram a integridade da mucosa intestinal, pelo que a doença entra num “ciclo vicioso” (Giacomin, Agha, & Loukas, 2016).

Após análise da figura 8, é possível perceber que as respostas imunitárias Th2 induzidas pelos Helmintas protegem o epitélio intestinal, devido à produção de citocinas tipo Th2 anti-inflamatórias, como por exemplo a IL-22, uma interleucina importante que têm como função a reestruturação da barreira intestinal, e de linfócitos Tregs que provocam uma diminuição nos níveis de citocinas inflamatórias. Estes mecanismos estimulam ainda a produção de muco por parte das células caliciformes e a expressão de péptidos antimicrobianos nas células epiteliais, que previnem a fixação de bactérias. A melhoria da integridade da barreira intestinal permite a multiplicação de bactérias que promovem a homeostasia intestinal, tais como as do género *Clostridiales*, sendo que a coadunação de todos estes processos limita a inflamação e atenua as DII (Leung & Loke, 2013).

Motivados pelos resultados de vários estudos epidemiológicos, vários investigadores procuraram avaliar a utilização terapêutica de Helmintas em roedores com modelos de Colite Induzida (CI) por vários agentes químicos, cuja fisiopatologia é bastante semelhante à evolução clínica das DII (Reyes et al., 2015).

Após utilização experimental do nematoda *Heligmosomoides bakeri*, do trematoda *Schistosoma mansoni* e do cestoda *Hymenolepis diminuta*, concluiu-se que a exposição a estes Helminthas conferia protecção em roedores com CI, sendo que esta protecção está relacionada com um aumento na produção de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  e a uma inibição da libertação de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-12/IL-23 por parte de linfócitos, macrófagos e CD presentes no intestino (Elliott et al., 2007).

Para além disto, a utilização do *H. bakeri* demonstrou ser capaz de provocar a remissão da doença ao induzir linfócitos Tregs e reduzir os níveis de citocinas inflamatórias em roedores com incapacidade de produzir IL-10, concomitante com um aumento do número de bactérias da família *Lactobacillaceae*, sendo que algumas espécies desta podem diminuir a inflamação intestinal (Elliott & Weinstock, 2012).

Adicionalmente, foram ainda realizados estudos com recurso aos Helminthas *Trichinella spiralis* e *Trichuris muris* que obtiveram resultados idênticos aos descritos e onde foi observado que as helmintoses podem proteger e/ou provocar a remissão da doença em roedores com CI. Devido às conclusões promissoras que foram alcançadas nestes estudos experimentais, foram realizados ensaios clínicos sendo, até à data, pioneiros no que diz respeito à terapia helmíntica (Niloofar et al., 2014).

Foram os investigadores Summers, Elliot e Weinstock, juntamente com outros colaboradores, os primeiros a estabelecer uma relação entre o número de casos de DII em países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento e propuseram que a restauração de um ambiente “menos higiénico” no intestino poderia ser benéfica em pacientes com DC e CU, o que vai de acordo com a “Hipótese de Higiene”. Assim, estes realizaram um ensaio clínico com recurso a ovos de *Trichuris suis*, durante 24 semanas, procurando avaliar a sua eficácia e segurança em pacientes com DC, tendo para isso medido o índice de actividade da DC (Hunter & McKay, 2004).

Os resultados foram bastante auspiciosos e inesperados. O tratamento com ovos de *T.suis* por 24 semanas demonstrou uma taxa de remissão de 73%, algo notável uma vez que muitos dos pacientes tinham a forma refractária da doença. Assim, esta terapia pode produzir melhorias substanciais e prolongadas em pacientes com DC, com uma marcada ausência de efeitos adversos. Summers e seus colaboradores apontaram a alteração de uma resposta imunitária Th1 para Th2 como mecanismo responsável pelo efeito terapêutico verificado (Summers, Elliott, Urban, Thompson, & Weinstock, 2005).

Em 2006, Croese e colaboradores efectuaram um ensaio clínico para avaliar a eficácia e tolerabilidade da infecção propositada pelo ancilostomídeo *Necator americanus* em pacientes com DC, tendo concluído que, após 20 semanas da infecção, houve uma melhoria significativa no índice de actividade da doença, coincidente com uma melhoria nos questionários com o propósito de avaliar a manutenção ou remissão dos sintomas da DC. Apesar dos resultados positivos, houve a ocorrência de prurido (associado à entrada do parasita pela pele) e de enteropatia até estarem decorridas 17 semanas. Mesmo assim, os investigadores descreveram a utilização terapêutica do *N. americanus* como segura e aparentemente eficaz, podendo os resultados variar de paciente para paciente (Croese et al., 2006).

Em suma, é possível concluir que, aparentemente, é nas DII que os Helmintas possuem maior efeito terapêutico, algo que poderá estar relacionado com o facto de estes contactarem directamente com a mucosa intestinal, não sendo necessária uma imunomodulação sistémica para que exerçam um efeito benéfico sobre este tipo de patologias. Os ensaios clínicos com recurso ao *T. suis* e ao *N. americanus* obtiveram resultados bastante positivos, pelo que é possível apurar que os Helmintas são capazes de atenuar e, por vezes, causar a remissão da inflamação crónica em pacientes com DII. Actualmente, a terapia helmíntica por *T. suis* encontra-se já aprovada e patenteada pela indústria farmacêutica. No entanto, a sua utilização clínica é, ainda, bastante incomum, sendo necessários mais estudos que permitam identificar e caracterizar as moléculas produzidas por este e outros Helmintas, para que haja um aumento na eficácia terapêutica deste tipo de terapia (Heylen et al., 2014).

## 4.6 Efeitos adversos

Tal como todos os medicamentos e terapias existentes, a utilização terapêutica dos Helmintas pode acarretar alguns efeitos adversos que constituem entraves ao interesse na investigação e pesquisa acerca da melhor forma de potenciar este tipo de terapia. De facto, vários investigadores referem que a terapêutica com recurso a Helmintas vivos pode trazer algumas desvantagens tais como uma helmintose agravada acidentalmente com os respectivos sintomas, respostas imunitárias reduzidas relativamente a vírus, bactérias, fungos e protozoários (especialmente em indivíduos imunocomprometidos) com um aumento na susceptibilidade a estas infecções, diminuição e/ou perda de eficácia de vacinas, reacções atópicas e/ou alérgicas e ainda fraca aceitação dos ovos ou parasitas utilizados (Sima et al., 2016).

Devido ao facto de ser necessária uma elevada carga parasitária para que haja eficácia clínica de terapias com recurso a Helmintas, tal pode despoletar efeitos adversos inaceitáveis para doenças que não constituem uma ameaça de vida e que se encontram, actualmente, mais ou menos controladas através de esteroides ou de outros medicamentos (Erb, 2009). Apesar de realmente poderem existir problemas decorrentes do uso terapêutico de Helmintas, a maior parte dos estudos experimentais e ensaios clínicos não acusaram efeitos adversos graves, pelo que a terapia foi considerada como segura, mesmo em casos onde não se verificou nenhum efeito benéfico (Voldsgaard et al., 2014).

Isto foi particularmente esclarecido em estudos onde foi utilizado o *Trichuris suis*, mesmo tendo havido a ocorrência de diarreia e de dores abdominais, enquanto que os ensaios clínicos com recurso ao ancilostomídeo *Necator americanus* demonstraram uma maior severidade nos efeitos adversos gastrointestinais, para além de alguns pacientes terem sido afectados por urticária localizada na zona onde houve a entrada do parasita. Adicionalmente, alguns pacientes reportaram ainda alguma fadiga e mal-estar, tendo os autores concluído que tal se deveu à eosinofilia sistémica e não por efeito directo dos parasitas (Correale, 2014).

Devido à (quase) ausência de efeitos adversos resultantes da terapia helmíntica, o Dr. Joel Weinstock considera que o risco de ocorrência dos mesmos é negligenciável, enquanto a sociedade mantiver os padrões de vida actuais, pois a morbilidade de



doenças imunológicas associada à toxicidade e efeitos adversos das terapias actuais ultrapassa os riscos consideráveis da exposição helmíntica (Weinstock, 2012).

Concluindo, é possível que se possa evitar a existência de efeitos adversos decorrentes deste tipo de terapias ao utilizar cargas parasitárias reduzidas que, no entanto, podem demonstrar uma eficácia clínica inferior ou através da exclusiva utilização de antígenos E/S, como por exemplo a ES-62, obtidos a partir dos *Helminths*, diminuindo assim a probabilidade de ocorrência de danos no hospedeiro decorrentes da fisiopatologia das helmintoses (Correale & Farez, 2012).

## Conclusões

Ao longo desta monografia abordaram-se diversas matérias sobre os Helmintas e, concretamente, sobre a maneira de como estes podem ser utilizados terapeuticamente num leque bastante alargado de patologias. Como revisto anteriormente, os Helmintas possuem fortes mecanismos imunomoduladores que não só asseguram a sua sobrevivência no interior dos hospedeiros que colonizam, como alteram a intensidade das respostas imunitárias direccionadas por estes a antígenos não-parasíticos, como os alérgenos ou auto antígenos.

Estes mecanismos aparentam apenas ser implementados após os parasitas permanecerem no hospedeiro durante algum tempo, que pode variar de espécie para espécie, e resumem-se, maioritariamente mas não exclusivamente, à activação e aumento de actividade de linfócitos Bregs, linfócitos Tregs, MAA, acompanhada por uma alteração na actividade de CD, eosinófilos e de outras células envolvidas nos processos imunológicos. Estas mudanças ocorridas no “ambiente” imunológico resultam num “desvio” das respostas imunitárias Th1 em direcção a um perfil Th2, em que há uma imensa produção de citocinas anti-inflamatórias como, por exemplo, a IL-4, a IL-10 e o TGF- $\beta$  associada a uma diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-12, IL-17 e IFN- $\gamma$ , entre outras. Para além disso, os Helmintas têm ainda a capacidade de induzir uma mudança na classe de anticorpos produzidos pelos Linfócitos B, favorecendo a produção de IgG4 e IgA, que por sua vez, podem suprimir as respostas mediadas por IgE.

Relativamente a um efeito terapêutico concreto exercido pelas várias espécies de Helmintas nas várias doenças, os estudos sugerem que os ovos de *Trichuris suis* são o esquema terapêutico mais utilizado pelos investigadores e que obteve os resultados positivos mais promissores, principalmente nas DII. No entanto, os dados apontam para que outras espécies, como por exemplo o *Schistosoma mansoni*, o *Necator americanus*, entre outras, também possam exercer um efeito benéfico no processo inflamatório de várias doenças.

Existem alguns riscos associados à exposição aos Helmintas, tais como o comprometimento da função imunitária relativamente a outros agentes patogénicos que não os parasitas, a diminuição da eficácia de vacinas, a ocorrência de reacções alérgicas e/ou atópicas, entre outras. Para além disto, certos pacientes podem-se revelar pouco

receptivos à ideia de serem inoculados com parasitas, por falta de confiança de que essa alternativa terapêutica possa gerar efeitos benéficos. Mesmo assim, muitos dos ensaios clínicos efectuados até à data demonstraram que a utilização terapêutica dos Helmintas não está associada à ocorrência de efeitos adversos, tendo sido, em muitos casos, bem tolerada e segura.

Muitas questões permanecem ainda por esclarecer quanto a um possível uso terapêutico dos Helmintas e existem diversos aspectos dos mecanismos imunoreguladores por eles induzidos que ainda não estão totalmente compreendidos. Como tal, existem ainda muitas variáveis que necessitam de ser esclarecidas para que se possa “transportar” todo o conhecimento obtido nesta área para a prática clínica. Qual a melhor espécie para que haja um efeito terapêutico? Qual a duração e frequência da terapia para que esta possa ser eficaz? A terapêutica helmíntica é realmente segura em todos os pacientes? A utilização de moléculas produzidas pelos Helmintas são tão eficazes quanto a utilização dos próprios parasitas? Estas são apenas algumas das perguntas que ainda carecem de resposta.

O futuro revela-se promissor no que toca ao aprimoramento das estratégias até agora aprendidas relativamente ao uso terapêutico dos Helmintas. Uma das maiores áreas de interesse por explorar é a identificação, caracterização e possível produção de moléculas excretadas por estes parasitas, uma vez que não implica a necessidade de infectar os pacientes, podendo assim evitar efeitos adversos. Neste aspecto, a ES-62 produzida pela *A. vitae* é a que tem vindo a demonstrar resultados mais auspiciosos, apesar de não ser ainda comercializada.

Com a evolução tecnológica e com um melhor entendimento dos processos pelos quais os Helmintas influenciam o nosso SI, é possível que se consiga atingir todo o potencial terapêutico destas terapias alternativas, pois poderão ser identificadas novas moléculas de várias espécies que podem mudar o paradigma actual e tornar a utilização terapêutica dos Helmintas uma opção terapêutica viável, segura e eficaz em inúmeras patologias.

## Bibliografia

- Achim, Hubner, Afiat, M. P. B., Jesuthas, A., Ajeng P.F., W., & Hoerauf. (2015). Parasitic helminths and their beneficial impact on type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(32), 238–250.
- Ajendra, J., Berbudi, A., Hoerauf, A., & Hübner, M. P. (2016). Combination of worm antigen and proinsulin prevents type 1 diabetes in NOD mice after the onset of insulinitis. *Clinical Immunology*, 164, 119–122.
- Allen, J. E., Sutherland, T. E., & Rückerl, D. (2015). IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. *Current Opinion in Immunology*, 34, 99–106.
- Amdare, N., Khatri, V., Yadav, R. S. P., Tarnekar, a., Goswami, K., & Reddy, M. V. R. (2015). *Brugia malayi* soluble and excretory-secretory proteins attenuate development of streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. *Parasite Immunology*, 37(12), 624–634.
- Amu, S., Saunders, S. P., Kronenberg, M., Mangan, N. E., Atzberger, A., & Fallon, P. G. (2010). Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(5), 1114–1124.e8.
- Bashi, T., Bizzaro, G., Ben-Ami Shor, D., Blank, M., & Shoenfeld, Y. (2014). The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 14(2), 98–104.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., & Hotez, P. J. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, 367.
- Bourke, C. D., Mutapi, F., Nausch, N., Photiou, D. M. F., Poulsen, L. K., Kristensen, B., ... Bager, P. (2012). *Trichuris suis* ova therapy for allergic rhinitis does not affect allergen-specific cytokine responses despite a parasite-specific cytokine response. *Clinical and Experimental Allergy*, 42(11), 1582–1595.
- Brooker, S., Clements, a. C. a, & Bundy, D. a P. (2006). Global Epidemiology,

- Ecology and Control of Soil-Transmitted Helminth Infections. *Advances in Parasitology*, 62(5), 221–261.
- Brown, M. (2011). Intestinal Helminths. *Parasite (Paris, France)*, 18(2), 189–196.
- Campolina, S. S., Araujo, M. S. S., Rezende, T. M. R. L., Matoso, L., Quites, H. F. O., Teixeira-Carvalho, A., ... Correa-Oliveira, R. (2015). Effective anthelmintic therapy of residents living in endemic area of high prevalence for Hookworm and *Schistosoma mansoni* infections enhances the levels of allergy risk factor anti-Der p1 IgE. *Results in Immunology*, 5, 6–12.
- Carranza, F., Falcón, C. R., Nuñez, N., Knubel, C., Correa, S. G., Bianco, I., ... Cervi, L. (2012). Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *PLoS ONE*, 7(7).
- Chiodini, P. L., Moody, A. H., & Manser, D. W. (2003). Atlas of Medical Helminthology and Protozoology.
- Correale, J. (2014). Helminth/Parasite Treatment of Multiple Sclerosis. *Current Treatment Options in Neurology*, 16(6).
- Correale, J., & Farez, M. F. (2012). Does helminth activation of toll-like receptors modulate immune response in multiple sclerosis patients? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(August), 1–14.
- Croese, J., O'neil, J., Masson, J., Cooke, S., Melrose, W., Pritchard, D., & Speare, R. (2006). A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut*, 55(1), 136–137.
- Daniłowicz-Luebert, E., O'Regan, N. L., Steinfelder, S., & Hartmann, S. (2011). Modulation of specific and allergy-related immune responses by helminths. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- De Silva, N. R., Brooker, S., Hotez, P. J., Montresor, A., Engels, D., & Savioli, L. (2003). Soil-transmitted helminth infections: Updating the global picture. *Trends in Parasitology*, 19(12), 547–551.
- Ebner, F., Hepworth, M. R., Rausch, S., Janek, K., Niewianda, a., Kühl, a., ... Hartmann, S. (2014). Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of

- the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69(11), 1489–1497.
- Eissa, M. M., Mostafa, D. K., Ghazy, A. a., El azzouni, M. Z., Boulos, L. M., & Younis, L. K. (2016). Anti-Arthritic Activity of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* Derived-Antigens in Adjuvant Arthritis in Rats: Role of FOXP3<sup>+</sup> Treg Cells. *Plos One*, 11(11), e0165916.
- El-Malky, M., Nabih, N., Heder, M., Saudy, N., & El-Mahdy, M. (2011). Helminth infections: Therapeutic potential in autoimmune disorders. *Parasite Immunology*, 33(11), 589–593.
- Elliott, D. E., Summers, R. W., & Weinstock, J. V. (2007). Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *International Journal for Parasitology*, 37(5), 457–464.
- Elliott, D. E., & Weinstock, J. V. (2012). Where are we on worms? *Current Opinion in Gastroenterology*, 28(6), 551–556.
- Erb, K. J. (2009). Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends in Immunology*, 30(2), 75–82.
- Evans, H., & Mitre, E. (2015). Worms as therapeutic agents for allergy and asthma: Understanding why benefits in animal studies have not translated into clinical success. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(2), 343–353.
- Faz-lópez, B., Morales-montor, J., & Terrazas, L. I. (2016). Role of Macrophages in the Repair Process during the Tissue Migrating and Resident Helminth Infections, 2016.
- Finlay, C. M., Stefanska, A. M., Walsh, K. P., Kelly, P. J., Boon, L., Lavelle, E. C., ... Mills, K. H. G. (2016). Helminth Products Protect against Autoimmunity via Innate Type 2 Cytokines IL-5 and IL-33, Which Promote Eosinophilia. *The Journal of Immunology*, 196(2), 703–714.
- Finlay CM, Walsh KP, & Mills KH. (2014). Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. - PubMed - NCBI, 259, 206–230.
- Fleming, J. O. (2011). Helminths and multiple sclerosis: Will old friends give us new

- treatments for MS? *Journal of Neuroimmunology*, 233(1–2), 3–5.
- Fleming, J. O. (2013). Helminth therapy and multiple sclerosis. *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), 259–274.
- Giacomin, P., Agha, Z., & Loukas, A. (2016). Helminths and Intestinal Flora Team Up to Improve Gut Health. *Trends in Parasitology*, 32(9), 664–666.
- Harnett, W. (2014). Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(2), 1–7.
- Harris, N., & Gause, W. C. (2011). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends in Immunology*, 32(2), 80–88.
- Hasby, E. A., Hasby Saad, M. A., Shohieb, Z., & El Noby, K. (2015). FoxP3+ T regulatory cells and immunomodulation after *Schistosoma mansoni* egg antigen immunization in experimental model of inflammatory bowel disease. *Cellular Immunology*, 295(1), 67–76.
- Helmby, H. (2009). Helminths and our immune system: Friend or foe? *Parasitology International*, 58(2), 121–127.
- Helmby, H. (2015). Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand? *BMC Immunology*, 16(1), 1–5.
- Heylen, M., Ruysers, N. E., Gielis, E. M., Vanhomwegen, E., Pelckmans, P. A., Moreels, T. G., ... De Winter, B. Y. (2014). Of worms, mice and man: An overview of experimental and clinical helminth-based therapy for inflammatory bowel disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 143(2), 153–167.
- Hunter, M. M., & McKay, D. M. (2004). Review article: helminths as therapeutic agents for inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 19(2), 167–177.
- Hussaarts, L., Van Der Vlugt, L. E. P. M., Yazdanbakhsh, M., & Smits, H. H. (2011). Regulatory B-cell induction by helminths: Implications for allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(4), 733–739.
- Januskevicius, A., Gosens, R., Sakalauskas, R., Vaitkiene, S., Janulaityte, I., Halayko, A. J., ... Malakauskas, K. (2017). Suppression of Eosinophil Integrins Prevents

- Remodeling of Airway Smooth Muscle in Asthma. *Frontiers in Physiology*, 7(January), 1–13.
- Jeffrey, H. ., & Leach, R. . (1991). *Atlas of Medical Helminthology and Protozoology* (3rd Edition).
- Johnston, C. J. C., Robertson, E., Hargus, Y., Grainger, J. R., Coakley, G., Smyth, D. J., ... Maizels, R. (2015). Cultivation of Heligmosomoides Polygyrus: An Immunomodulatory Nematode Parasite and its Secreted Products. *Journal of Visualized Experiments*, (98), 1–10.
- Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., & Toubi, E. (2012). Human CD19+CD25high B regulatory cells suppress proliferation of CD4+ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity Reviews*, 11(9), 670–677.
- Labuda, L. a., Ateba-Ngoa, U., Feugap, E. N., Heeringa, J. J., van der Vlugt, L. E. P. M., Pires, R. B. a, ... Smits, H. H. (2013). Alterations in Peripheral Blood B Cell Subsets and Dynamics of B Cell Responses during Human Schistosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3).
- Leung, J. M., & Loke, P. (2013). A role for IL-22 in the relationship between intestinal helminths, gut microbiota and mucosal immunity. *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), 253–257.
- Lund, M. E., O'Brien, B. a, Hutchinson, A. T., Robinson, M. W., Simpson, A. M., Dalton, J. P., & Donnelly, S. (2014). Secreted proteins from the helminth Fasciola hepatica inhibit the initiation of autoreactive T cell responses and prevent diabetes in the NOD mouse. *PloS One*, 9(1), e86289.
- Maizels, R. M. (2016). Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(6), 481–486.
- Maizels, R. M., & McSorley, H. J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3), 666–675.
- McSorley, H. J., Gaze, S., Daveson, J., Jones, D., Anderson, R. P., Clouston, A., ... Loukas, A. (2011). Suppression of inflammatory immune responses in celiac disease by experimental hookworm infection. *PLoS ONE*, 6(9), 3–9.



- Méndez-samperio, P. (2016). Molecular events by which dendritic cells promote Th2 immune protection in helminth infection. *Taylor & Francis*, 4235(June).
- Méndez-samperio, P., & Arana, J. L. de-la-R. (2015). Prevention of type 1 diabetes through parasite infection. *Future Medicine*, (1), 595–598.
- Mendlovic, F., Cruz-Rivera, M., Ávila, G., Vaughan, G., & Flisser, A. (2015). Cytokine, Antibody and Proliferative Cellular Responses Elicited by *Taenia solium* Calreticulin upon Experimental Infection in Hamsters. *Plos One*, 10(3), e0121321.
- Mortimer, K., Brown, A., Feary, J., Jagger, C., Lewis, S., Antoniak, M., ... Britton, J. (2006). Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with necator Americanus in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), 914–920.
- Mota, P., Reddy, V., & Isenberg, D. (2016). Improving B-cell Depletion in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Expert Review of Clinical Immunology*, 0(0), 1744666X.2017.1259068.
- Mulcahy, G., O'Neill, S., Donnelly, S., & Dalton, J. P. (2004). Helminths at mucosal barriers - Interaction with the immune system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(6), 853–868.
- Munder, M. (2009). Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system: REVIEW. *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 638–651.
- Niklas, K., Niklas, A. a., Majewski, D., & Puszczewicz, M. (2016). Rheumatic diseases induced by drugs and environmental factors: The state-of-the-art - Part one. *Reumatologia*, 54(3), 122–127.
- Nilloofar, T., Hamid, A., Ali, H., Nariman, M., Seyyed, T., & Nejad-Rostami, M. (2014). Potential treatment of inflammatory bowel disease: a review of helminths therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 7(7), 9–16.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., & Bach, J.-F. (2010). The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical & Experimental Immunology*, 160(1), 1–9.
- Osada, Y., & Kanazawa, T. (2010). Parasitic helminths: New weapons against immunological disorders. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.

- Reyes, J. L., Wang, a, Fernando, M. R., Graepel, R., Leung, G., Van Rooijen, N., ... McKay, D. M. (2015). Splenic B cells from hymenolepis diminuta-infected mice ameliorate colitis independent of T cells and via cooperation with macrophages. *Journal of Immunology*, 194(1), 364–378.
- Robinson, M. W., Dalton, J. P., O'Brien, B. a., & Donnelly, S. (2013). Fasciola hepatica: The therapeutic potential of a worm secretome. *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), 283–291.
- Rodgers, D. T., Pineda, M. a., Mcgrath, M. a., Al-Riyami, L., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2014). Protection against collagen-induced arthritis in mice afforded by the parasitic worm product, ES-62, is associated with restoration of the levels of interleukin-10-producing B cells and reduced plasma cell infiltration of the joints. *Immunology*, 141(3), 457–466.
- Rosche, B., Wernecke, K.-D., Ohlraun, S., Dörr, J.-M., & Paul, F. (2013). Trichuris suis ova in relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome (TRIOMS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 14, 112.
- Rottem, M., Geller-Bernstein, C., & Shoenfeld, Y. (2015). Atopy and Asthma in Migrants: The Function of Parasites. *International Archives of Allergy and Immunology*, 167(1), 41–46.
- Ruyssers, N. E., De Winter, B. Y., De Man, J. G., Loukas, A., Herman, A. G., Pelckmans, P. a., & Moreels, T. G. (2008). Worms and the treatment of inflammatory bowel disease: Are molecules the answer? *Clinical and Developmental Immunology*, 2008.
- Sakamoto, Y., Hiromatsu, K., Ishiwata, K., Inagaki-Ohara, K., Ikeda, T., Nakamura-Uchiyama, F., & Nawa, Y. (2004). Chronic intestinal nematode infection induces Stat6-independent interleukin-5 production and causes eosinophilic inflammatory responses in mice. *Immunology*, 112(4), 615–623.
- Sanin, D. E., Prendergast, C. T., Bourke, C. D., & Mountford, A. P. (2015). Helminth Infection and Commensal Microbiota Drive Early IL-10 Production in the Skin by CD4+ T Cells That Are Functionally Suppressive. *PLOS Pathogens*, 11(5), e1004841.
- Schabussova, I., & Wiedermann, U. (2014). Allergy and worms: let's bring back old

- friends? *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164(19–20), 382–391.
- Shor, D. B.-A., & Shoenfeld, Y. (2013). Autoimmunity: Will worms cure rheumatoid arthritis? *Nature Reviews. Rheumatology*, 9(3), 138–40.
- Sima, P. S., Borji, H., Ahmadsreza, M., Mohammadreza, K., Hamidreza, F., & Mohsen, M. (2016). Anti-inflammatory potentials of excretory/secretory (ES) and somatic products of *Marshallagia marshalli* on allergic airway inflammation in BALB/c mice. *Iranian Journal of Parasitology*, 11(4), 515–526.
- Song, X., Shen, J., Wen, H., Zhong, Z., Luo, Q., Chu, D., ... Wei, W. (2011). Impact of *Schistosoma japonicum* infection on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: A murine model of human rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, 6(8).
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R., & Weinstock, J. V. (2005). *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54(1), 87–90.
- Sun, S., Wang, X., Wu, X., Zhao, Y., Wang, F., Liu, X., ... Liu, M. (2011). Toll-like receptor activation by helminths or helminth products to alleviate inflammatory bowel disease. *Parasites & Vectors*, 4(1), 186.
- Szkudlarski, D., Labuzek, K., Pokora, Z., Smyla, N., Gonciarz, M., Mularczyk, A., ... Okopien, B. (2014). The emerging role of helminths in treatment of the inflammatory bowel disorders. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(6), 741–751.
- Tahapary, D. L., de Ruiter, K., Martin, I., van Lieshout, L., Guigas, B., Soewondo, P., ... Supali, T. (2015). Helminth infections and type 2 diabetes: a cluster-randomized placebo controlled SUGARSPIN trial in Nangapanda, Flores, Indonesia. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 133.
- Tanasescu, R., & Constantinescu, C. (2014). Helminth Therapy for MS. *Springer International Publishing Switzerland 2014*, (November 2014).
- Tian, F., Hu, X., Xian, K., Zong, D., Liu, H., Wei, H., ... Qian, L. (2015). B10 cells induced by *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens modulated regulatory T cells and cytokine production of T cells. *Parasitology Research*, 114(10), 3827–3834.
- Tilp, C., Kapur, V., Loging, W., & Erb, K. J. (2013). Prerequisites for the

- pharmaceutical industry to develop and commercialise helminths and helminth-derived product therapy. *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), 319–325.
- Van Der Vlugt, L. E. P. M., Zinsou, J. F., Ozir-Fazalalikhan, A., Kremsner, P. G., Yazdanbakhsh, M., Adegnik, A. a., & Smits, H. H. (2014). Interleukin 10 (IL-10)-producing CD1d<sup>hi</sup> regulatory B cells from *Schistosoma haematobium*-infected individuals induce IL-10-positive T cells and suppress effector T-cell cytokines. *Journal of Infectious Diseases*, 210(8), 1207–1216.
- van Riet, E., Hartgers, F. C., & Yazdanbakhsh, M. (2007). Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology*, 212(6), 475–490.
- Versini, M., Bizzaro, G., & Shoenfeld, Y. (2015). Helminths and Autoimmunity: the Good, the Bad and the Ugly, 17(april), 249–250.
- Vitale, Gaetano; Mion, F. (2014). *Regulatory B Cells* (1st ed.). Humana Press.
- Voldsgaard, A., Bager, P., Garde, E., Åkeson, P., Leffers, a M., Madsen, C. G., ... Sørensen, P. S. (2014). Trichuris suis ova therapy in relapsing multiple sclerosis is safe but without signals of beneficial effect. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 21(13), 1723–9.
- Weinstock, J. V. (2012). The Worm Returns. *Science*, 276(5319), 1656–1656.
- Wiria, A. E., Hamid, F., Wammes, L. J., Prasetyani, M. a., Dekkers, O. M., May, L., ... Smit, J. W. a. (2015). Infection with Soil-Transmitted Helminths Is Associated with Increased Insulin Sensitivity. *Plos One*, 10(6), e0127746.
- Zaccone, P., & Cooke, A. (2013). Vaccine against autoimmune disease: Can helminths or their products provide a therapy? *Current Opinion in Immunology*, 25(3), 418–423.
- Zakeri, A., Borji, H., & Haghparast, A. (2016). Interaction between Helminths and Toll-Like Receptors: Possibilities and Potentials for Asthma Therapy. *International Reviews of Immunology*, 185(May), 0
- Zeller, L., Barski, L., Shleyfer, E., Netz, U., Stavi, V., & Abu-Shakra, M. (2015). *Taenia solium* in a patient with systemic lupus erythematosus: do parasites protect

against autoimmune diseases. *The Israel Medical Association Journal : IMAJ*, 17(4), 259–60.